

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR DYNAMIK IN PROTEIN-LÖSUNGSMITTEL-SYSTEMEN

vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des Grades
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dominik Demuth

Referent: Prof. Dr. Michael Vogel

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Stühn

Darmstadt 2019

DOMINIK DEMUTH:

Experimentelle Untersuchungen zur Dynamik in Protein-Lösungsmittel-Systemen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020

Tag der mündlichen Prüfung : 09. Dezember 2019

Die Veröffentlichung steht unter folgender Creative Commons Lizenz:

Namensnennung–Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>

ABSTRACT

Protein dynamics are basic necessities of their functionality and therefore of life. The environment of a protein plays a crucial role to enable protein mobility. Although this view is largely uncontested, the interactions between protein and its surrounding solvent are still not understood on a microscopic level. To approach this issue both protein and solvent were varied. In particular, the structurally highly different proteins elastin and lysozyme were used. Various solvents were studied to alter the properties of the solvent shell. For this purpose, water, glycerol, and binary mixtures of water-glycerol were used in conjunction with elastin; binary mixtures of water-dimethyl sulfoxide together with lysozyme. A combination of quasielastic neutron scattering, dielectric spectroscopy, and nuclear magnetic resonance spectroscopy were applied over a wide temperature range in order to take advantage of these methods' respective strengths.

For elastin in pure glycerol, the dependence of protein dynamics on solvation was investigated. Larger-scale fluctuations of the protein backbone require a minimum glycerol concentration of 0.6 g/g at ambient temperature, while smaller-scale fluctuations are activated at lower solvation levels of 0.2 g/g. In all systems an intimate coupling of protein dynamics to the solvent can be found.

In the case of binary solvents, elastin dynamics exhibit a strong dependence on solvent composition and, thus, solvent viscosity. In contrast, the solvent's dependence on composition is reduced at protein surfaces. However, a strong dependence on solvation can be observed for glycerol. In the absence of large-scale protein fluctuations, i.e. at low solvation levels, glycerol dynamics are retarded and more Arrhenius-like compared to the respective bulk dynamics. For higher solvation levels, solvation dynamics take place on a comparable timescale as its bulk counterpart but are symmetrically broadened and show signs more closely associated with secondary relaxation processes.

The mean squared displacement of hydrated elastin, observed via neutron scattering, exhibits two dynamic transition of protein dynamics that are enabled by hydration: One located at 320 K appears as a result of the protein's glass transition. It is shown that the second transition at 200 K is largely independent of the kind of protein. The origin of this transition is connected with a glass-like arrest of a secondary relaxation protein process and may be linked with the onset of small-angle backbone fluctuation found in previous studies.

Theoretical models of protein-solvent interaction are juxtaposed against the background of the experimental findings. None of the discussed models is able to satisfactorily explain all experimental results proofing the need for more refined descriptions.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Proteindynamik ist eine grundsätzliche Notwendigkeit für ihre Funktionalität und ermöglicht Leben. Die Umgebung eines Proteins spielt eine entscheidende Rolle dabei, die Beweglichkeit von Proteinen zu ermöglichen. Obwohl diese Auffassung kaum bestritten wird, sind die mikroskopischen Ursachen der Wechselwirkungen zwischen einem Protein und dem umgebenden Lösungsmittel noch nicht vollständig geklärt. In dieser Arbeit wurden sowohl das Protein als auch das Lösungsmittel variiert, um sich dieser Problematik zu nähern. Im Speziellen wurden die strukturell höchst unterschiedlichen Proteine Elastin und Lysozym verwendet. Es wurden verschiedene Lösungsmittelsysteme untersucht um die Eigenschaften der Lösungsmittelhülle zu verändern. Zu diesem Zweck wurden Wasser, Glycerin und binäre Wasser-Glycerin-Mischung in Verbindung mit Elastin sowie binäre Wasser-Dimethylsulfoxid-Mischungen zusammen mit Lysozym untersucht. Eine Kombination aus quasielastischer Neutronenstreuung, dielektrischer Spektroskopie und Kernspinresonanzspektroskopie wurde über einen großen Temperaturbereich angewendet, um die Stärken der einzelnen Methoden zu nutzen.

An Elastin in reinem Glycerin wurde die Abhängigkeit der Proteindynamik vom Solvatationsgrad untersucht. Die untere Grenze für großamplitudige Fluktuationen des Proteinrückgrats liegt bei Umgebungstemperatur durch einen Solvatationsgrad $0,6 \text{ g/g}$, während kleinamplitudige Fluktuationen bereits bei einem niedrigeren Solvatationsgrad von $0,2 \text{ g/g}$ aktiviert werden. Alle Systeme zeigen eine enge Kopplung der Proteindynamik an das Lösungsmittel.

In binären Mischungen weist Elastindynamik eine starke Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung und damit von der Viskosität des Lösungsmittels auf. Im Gegensatz dazu hängt die Lösungsmitteldynamik an der Proteinoberfläche nur schwach von der Zusammensetzung ab, es konnte aber eine starke Abhängigkeit vom Solvatationsgrad beobachtet werden. Glycerindynamik in den binären Mischungssystemen ist bei niedrigen Solvatationsgraden, d. h. bei Abwesenheit großamplitudiger Proteinfluktuationen, im Vergleich zum entsprechenden Bulksystem verlangsamt und stärker Arrhenius-förmig. Bei höheren Solvatationsgraden findet die Lösungsmitteldynamik auf einer zum entsprechenden Bulksystem vergleichbaren Zeitskala statt. Sie ist jedoch symmetrisch verbreitert und weist Kennzeichen auf, die mit sekundären Relaxationsprozessen verknüpft werden.

Das mittlere Verschiebungsquadrat hydratisierten Elastins, das mit Hilfe von Neutronenstreuung gewonnen wurde, zeigt auf der Nanosekundenzeitskala zwei Übergänge in der Temperaturabhängigkeit, die durch Hydratation ermöglicht werden: Ein Übergang der Proteindynamik bei 320 K tritt aufgrund des Glasübergangs des Proteinsystems auf. Es konnte gezeigt werden, dass der zweite Übergang bei 200 K nur schwach von der Wahl des Proteins abhängt.

Die Ursache dieses Übergangs ist verbunden mit einem dem Glasübergang ähnlichen Arrest eines sekundären Proteinprozesses. Dieser ist möglicherweise mit kleinwinkligen Fluktuationen des Proteinrückgrats verknüpft, die in früheren Untersuchungen beobachtet wurden.

Erklärungsansätze zur Beschreibung von Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkungen werden vor dem Hintergrund der experimentelle Befunde gegenübergestellt. Keines der diskutierten Modelle ist in der Lage, alle experimentellen Ergebnisse zufriedenstellend zu erklären, was den Bedarf für genauere Modellanschauungen zeigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Gläser und Proteine	4
2.1	Eigenschaften von glasbildenden Systemen	4
2.2	Proteine	8
2.3	Protein-Solvens-Modelle	13
3	Methodische Grundlagen	18
3.1	Korrelationsfunktion und Suszeptibilität	18
3.2	Magnetische Kernspinresonanz (NMR)	26
3.3	Untersuchung der Dynamik mit ^2H -NMR	32
3.4	Untersuchung mit ^{13}C -NMR: CPMAS-Pulsfolge	41
3.5	Quasielastische Neutronenstreuung	47
3.6	Dielektrische Spektroskopie	55
3.7	Gegenüberstellung der Messmethoden	59
4	Experimentelle Durchführung	63
4.1	Material	63
4.2	Übersicht über die vermessenen Systeme	65
4.3	Experimentelle Durchführung	67
4.4	Auswertung	69
5	QENS: Elastin-Wasser	70
5.1	Mittleres Verschiebungsquadrat	71
5.2	Quasielastische Intensität	75
5.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	81
6	NMR: Elastin in Glycerin und Wasser-Glycerin-Mischungen	87
6.1	Dynamik in Elastin-Glycerin-Mischungen	87
6.2	Elastindynamik in Elastin/Wasser-Glycerin-Mischungen	91
6.3	Glycerindynamik in Elastin/Wasser-Glycerin	94
6.4	Zusammenfassung	107
7	Dynamik von Lysozym/Wasser-DMSO	109
7.1	Differenzkalorimetrie an Lysozym-Wasser-DMSO	110
7.2	Dielektrische Spektroskopie an Lysozym/Wasser-DMSO	111
7.3	^2H -NMR: Wasserdynamik	127
7.4	^2H -NMR: DMSO-Dynamik	139
7.5	^{13}C -NMR-Spektren von Lysozym-Wasser/DMSO	149

7.6 Zusammenfassung	152
8 Vergleich der Systeme und Diskussion	155
8.1 Proteindynamik	155
8.2 Lösungsmitteldynamik	156
8.3 Dynamischer Übergang	157
8.4 Modelle zur Wechselwirkung zwischen Proteinen und Lösungsmittel	159
9 Zusammenfassung	161
A. Auswerteprogramm	164
A.1 Anwendungsbeschreibung	164
A.2 Auswertung von Zeitsignalen	166
A.3 Fitfunktionen	166
B. Korrelationszeitenverteilungen	171
B.1 Havriliak-Negami-, Cole-Cole-, Cole-Davidson-Funktion	171
B.2 Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion	172
B.3 Gewichtungsfaktor $W(T)$ mit Reduktionsfaktor	173
B.4 Vergleich Cole-Cole-Funktion und Verteilung von Aktivierungsenergien	174
C. Dielektrische Spektroskopie	177
C.1 Nichtlinearität in dielektrischer Spektroskopie	177
C.2 Parameter der Elektrodenpolarisation	178
D. Proteinsequenzen und Aminosäuren	180
E. Phasenzyklen	183

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.1	Schematischer Korrelationsabfall und Temperaturabhängigkeit von Glasbildnern	5
2.2	Suszeptibilität von glasbildenden Systemen	7
2.3	Effekte des Glasübergangs auf experimentelle Größen	8
2.4	Struktureinheiten von Proteinen	9
2.5	Vergleich Protein-Glas: Paarverteilungsfunktion und Dynamik	10
2.6	Energielandschaftsmodell	11
2.7	Lösungsmitteldynamik am Protein	12
2.8	Dynamische Prozesse in Protein-Lösungsmittel-Systemen	12
2.9	Dynamischer Übergang	14
3.1	Mittag-Leffler-Funktion	21
3.2	Logarithmische Gaußverteilung	22
3.3	Verteilungen von Korrelationszeiten und Suszeptibilitäten	24
3.4	Charakteristische Zeiten	25
3.5	Orientierung des Hauptachsensystems	29
3.6	Isotrope chemische Verschiebungen von ^{13}C -Verbindungen	32
3.7	Freier Induktionszerfall und Festkörperecho	33
3.8	Schematische Darstellung der Saturation-Recovery-Pulsfolge	34
3.9	Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxation von spektralen Dichten	35
3.10	^2H -Linienform	36
3.11	Reduktionsfaktor	37
3.12	Zweikomponentenspektren	38
3.13	Stimulierte-Echo-Pulsfolge	39
3.14	Evolutionszeitabhängigkeit des Stimulierten Echos	41
3.15	CPMAS-Pulsfolge	42
3.16	Zeitabhängigkeit der Kreuzpolarisation in Glycin	44
3.17	Magic Angle Spinning	45
3.18	Streuung	47
3.19	Streuquerschnitte der Isotope	49
3.20	Aufbau eines Rückstreuспекrometers.	51
3.21	Strukturfaktor trockenen Elastins	52
3.22	Quasielastische Intensität	54
3.23	Schematischer Messaufbau in der dielektrischen Spektroskopie	57
3.24	Dielektrisches Spektrum	58
3.25	Vergleich von ϵ'' , ϵ' , ϵ''_d	59
3.26	Selektivität der Messmethoden	60
3.27	Zeitskalen von Experimenten und NMR-Wechselwirkungen	61

4.1	Glasübergang von hydratisierten Proteinen	64
4.2	Chemische Strukturen der Lösungsmittel	64
4.3	Energieauflösung der Neutronenstreuung	68
5.1	Korrelationszeiten von Elastin-Wasser	71
5.2	Anpassung des mittleren Verschiebungsquadrats	72
5.3	Mittleres Verschiebungsquadrat von Elastin	73
5.4	Anharmonisches mittleres Verschiebungsquadrat von Elastin	74
5.5	Temperaturabhängigkeit der quasielastischen Intensität	75
5.6	Quasielastische Intensität von Elastin	77
5.7	Wasserbeitrag zur quasielastischen Intensität	78
5.8	Korrelationszeiten von Elastin-Wasser	81
5.9	Anpassung der quasielastischen Intensität	82
5.10	Dielektrischer Verlust $\epsilon''(\omega)$ des Hydratwassers	83
5.11	Vergleich von mittleren Verschiebungsquadraten	85
6.1	Zuordnung der Resonanzen im ^{13}C -Spektrum von Elastin	87
6.2	Solvationsabhängigkeit der Elastinspektren	88
6.3	Relative Höhe der aliphatischen Resonanzen	90
6.4	^{13}C -CPMAS-Spektren von Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen	91
6.5	Temperaturabhängigkeit der Elastinspektren in Wasser-Glycerin	92
6.6	Korrelationszeiten von Glycerin und Elastin	93
6.7	Aufbaukurven von Glycerin	96
6.8	$\langle T_1 \rangle$ -Zeiten von Glycerin in Elastin-Wasser-Glycerin	97
6.9	Reduktionsfaktor von Glycerin	98
6.10	Übergangsspektren und Gewichtungsfaktor $W(T)$ von Glycerin	99
6.11	Abfallkurven des Stimulierten Echos	100
6.12	Parameter aus Anpassung des Stimulierten Echos	101
6.13	Simulationen von Stimulierte-Echo-Abfallkurven mit T_1 -Abfall	102
6.14	Korrelationszeiten von Glycerin/Wasser-Glycerin	103
6.15	Magnetisierungsaufbau von Glycerin in Confinement	104
6.16	Vergleich der T_1 -Zeiten von Glycerin mit c-Phycocyanin	105
6.17	Confinement Vergleich in T_1 und Korrelationszeiten	106
7.1	DSC-Messungen an Lysozym-Lösungsmittel-Systemen	110
7.2	Dielektrische Permittivität $\epsilon^*(\omega)$ von trockenem Lysozym	112
7.3	Anpassung von trockenem Lysozym bei 180 K und 250 K	113
7.4	Parameter von trockenem Lysozym aus dielektrischer Spektroskopie	114
7.5	Permittivität $\epsilon^*(\omega)$ und Ableitung $\epsilon_d''(\omega)$ der 66 Mol-%-Probe bei 190 K	115
7.6	$\epsilon^*(\omega)$, $\epsilon_d''(\omega)$, Leitfähigkeitsdarstellung von 66 Mol-% und 33 Mol-%	116
7.7	Anpassung bei 210 K der 66 Mol-%-Probe	117
7.8	Gleichstromleitfähigkeit in Lysozym	118

7.9	Korrelationszeiten aus dielektrischer Spektroskopie	119
7.10	Dielektrische Stärke und Breitenparameter der Protein-Lösungsmittel- Systeme	120
7.11	Dielektrischer Verlust von DMSO-H ₂ O in Bulk und Protein bei 170 K .	121
7.12	τ_B in Abhängigkeit von τ_C	123
7.13	Proportionalität Korrelationszeit und Gleichstromleitfähigkeit	124
7.14	Proportionalität von τ_B und τ_A	125
7.15	Aufbaukurven der 66 Mol-%-Mischung	127
7.16	Mittlere Relaxationszeit $\langle T_1 \rangle$ von Wasser in Lysozym-DMSO-D ₂ O	128
7.17	Magnetisierung M und Streckungsparameter β von D ₂ O an Lysozym .	129
7.18	T_1 -Zeiten in Abhängigkeit vom verwendeten Protein	130
7.19	Gewichtungsfaktor von D ₂ O in Lysozym/Wasser-DMSO	131
7.20	Stimulierte-Echo-Messungen von D ₂ O	132
7.21	Korrelationszeiten der 66 Mol-%- und 33 Mol-%-Mischung	133
7.22	Tieftemperaturverhalten der Wasserdynamik	135
7.23	Korrelationszeiten von D ₂ O im Hochtemperaturbereich	136
7.24	Systemvergleich der T_1 -Zeit des Proteins	137
7.25	² H-NMR-Spektren von DMSO-d ₆	139
7.26	Sprung auf dem Konusrand und Sprung im Konus	140
7.27	Gewichtungsfaktor von DMSO-d ₆	141
7.28	Gewichtungsfaktor bei temperaturunabhängiger Verteilung $G(\ln \tau)$. .	142
7.29	Magnetisierungskurven von DMSO-d ₆	143
7.30	Magnetisierungskurven bei Berücksichtigung eines Reduktionsfaktors .	144
7.31	Streckungsparameter und Reduktionsfaktor von DMSO-d ₆	145
7.32	Korrelationsabfall und spektrale Dichte von DMSO	147
7.33	Anpassung der Relaxationsrate von DMSO-d ₆	148
7.34	Zuordnung von ¹³ C-Resonanzen in Lysozym	150
7.35	¹³ C-NMR-Spektren von Lysozym	151
7.36	Linienbreite in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels.	151
7.37	Korrelationszeiten der 66 Mol-%- und 33 Mol-%-Probe	152
8.1	Unterschiede im ¹³ C-NMR-Spektrum von Lysozym und Elastin	155
8.2	Korrelationszeiten der Lösungsmittel	156
8.3	Dynamische Übergänge bei 200 K	158
A.1	Integration über zwei Lorentzlinien.	165
A.2	Auswahl von Punkten im Auswertprogramm	166
A.3	Dialog zur Anpassung freier Diffusion	167
B.1	Parameter von Gleichung (B.9).	172
B.2	Gewichtungsfaktor bei Berücksichtigung des Reduktionsfaktor	173
B.3	Schema des Vergleichs von T_1 -Zeiten und Korrelationszeiten.	175

B.4	T_1 und Korrelationszeiten für Cole-Cole und Gaußverteilung	175
C.1	Abschätzung der Nichtlinearität in dielektrischer Spektroskopie	178
C.2	Parameter der Elektrodenpolarisation	178
D.1	Relative Anteile der Aminosäuren	181

TABELLENVERZEICHNIS

3.1 Übersicht über interne Wechselwirkungen	28
4.1 Binäre Mischungen	66
5.1 Temperaturabhängigkeit der Hydratwasserdynamik	80
6.1 Untersuchte Wasser-Glycerin-Mischungen	95
7.1 Wasser-DMSO-Mischungen	109
7.2 Anpassung an Gleichstromleitfähigkeit	119
7.3 Anpassung an Korrelationszeiten	134
7.4 Parameter aus der Anpassung der DMSO-Messungen	149
D.2 Liste der Aminosäuren	182
E.1 CYCLOPS-Phasenzyklus	183
E.2 CPMAS-Phasenzyklus	183
E.3 Phasenzyklus des Festkörperechos	184
E.4 Phasenzyklus des Zeeman-Experiments	184
E.5 Phasenzyklus des Spin-Alignment-Experiments	184

1 EINLEITUNG

Der menschliche Körper ist in der Lage, etwa 20000 unterschiedliche Proteine herzustellen.¹ Dort übernehmen sie die verschiedensten Aufgaben: Manche regulieren den Ionentransport durch Zellmembrane, andere sind Bestandteil des Stoffwechsels, wieder andere bestimmen die Struktur von Zellen, Haut, Haaren. Unabhängig von der genauen Art des Protein ist seine Funktion eng mit seiner Flexibilität verknüpft.² Im Allgemeinen wird angenommen, dass ein Protein flexibel und somit funktionell ist, wenn es von einer Hydrathülle umgeben ist.^{3,4} Das Einsetzen von Proteinmobilität wird meist für Hydratationsgrade $h \approx 0,3 \text{ g/g}$ beobachtet.⁵ Bisher konnte aber nicht endgültig geklärt werden, wie sich die Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel genau gestaltet, um die Funktionalität des Proteins zu gewährleisten. Auch der Einfluss eines Proteins auf die Dynamik des umgebenden Lösungsmittels ist noch nicht gänzlich verstanden.

Bis heute werden die Eigenschaften des Proteins häufig in verdünnten Lösungen untersucht.^{6–10} In Zellen sind Proteine jedoch nur von wenigen Lösungsmittelschichten umgeben, die zudem aus Mischungen aus Wasser und Kosolventia bestehen.^{11–14} Daher wird in jüngerer Vergangenheit die Protein-Lösungsmittel-Systemen bei niedrigen Hydratationsgraden betrachtet,^{15–17} um die Wechselwirkungen unter realistischen Bedingungen zu charakterisieren.

Anhand solcher Untersuchungen wurden Modelle entwickelt, um die Dynamik in Proteinsystemen zu beschreiben. So wurde beispielsweise vorgeschlagen, dass die Hydrathülle das Protein „versklavt“¹⁸ oder ein Weichmachereffekt durch sie postuliert.¹⁹ Diese Erklärungsmodelle werden in der Literatur jedoch kontroverse diskutiert.^{20–22} Auch darüber, welcher Prozess des Wassers für Kopplung mit dem Protein relevant ist, wird debattiert. Während einige Untersuchungen von einer Verbindung mit der strukturellen Relaxation des Hydratwassers ausgehen,²³ betrachten einige einen Sekundärprozess des Wasser als verantwortlich.^{18,24} Die Interpretation des Wasserprozesses wirkt sich auch auf die Frage aus, auf welche Komponente der Glasübergang von Protein-Wasser-Systemen zurückzuführen ist: Sowohl eine Zuordnung des Glasübergangs zur Proteindynamik²⁵ aber auch zur Dynamik des Hydratwassers^{17,23} wird diskutiert. Zur Beschreibung von Proteindynamik wird häufig der dynamische Übergang, d. h. eine Änderung der Temperaturabhängigkeit, im mittleren Verschiebungsquadrat aus Neutronenstreuung bei 180 K bis 240 K herangezogen.^{15,18,26} In diesem Temperaturbereich wird für einige Proteine ein Glasübergang beobachtet.^{27,28} Als mögliche Ursache des dynamischen Übergangs wird daher in manchen Studien auf den Glasübergang zurückgeführt,^{23,25} andere legen

* Als Hydratationsgrad wird das Massenverhältnis von Wasser zu trockenem Protein bezeichnet.

einen Zeitskaleneffekt zugrunde.¹⁸ In diesem Temperaturbereich wird zudem von Einsetzen von Proteinfunktionalität berichtet.^{29,30} Eine korrekte Interpretation von dynamischen Übergang oder dem Proteinglasübergang kann daher tiefere Einblicke in die Funktionsweise von Proteinen geben.

Die bisher genannten Beobachtungen und Modelle stammen meist von Untersuchungen an Modellproteinen und reinem Wasser als Lösungsmittel. Die Variation des Lösungsmittels kann Aufschlüsse darüber geben, welche Eigenschaften der Lösungsmittelhülle um das Protein dessen Dynamik beeinflussen. Der Einfluss von mehrkomponentigen Lösungsmittelmischungen auf das Protein ist zudem für Kryokonservierung von Relevanz.^{31–34} In dieser Arbeit werden daher Wasser und Glycerin als reine Lösungsmittel und Wasser-Glycerin- bzw. Wasser-Dimethylsulfoxid(DMSO)-Mischungen als binäre Lösungsmittel verwendet. Im gleichen Maße kann der Vergleich unterschiedlicher Proteine Erkenntnisse liefern, wie universell der Einfluss des Lösungsmittels auf die Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten ist oder ob proteinspezifische Eigenschaften berücksichtigt werden müssen. Das globuläre Protein Lysozym und das größtenteils strukturlose Elastin, die hier betrachtet werden, unterscheiden sich nicht nur strukturell, sondern auch in ihren kalorimetrisch beobachteten Glasübergangstemperaturen.^{27,35} Die Beobachtungen an diesen beiden Proteinen geben somit Informationen, in welchem Ausmaß proteinspezifische Eigenschaften die Lösungsmitteldynamik verändern.

Die Protein-Lösungsmittel-Systeme dieser Arbeit werden mittels quasielastischer Neutronenstreuung, dielektrischer Spektroskopie und Kernspinresonanz(NMR)-Methoden untersucht. Die Kombination dieser Methoden erlaubt es, sowohl einen großen dynamischen Bereich zu überblicken als auch die Dynamik einzelner Komponenten gezielt zu verfolgen. Dieser Ansatz wurde bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Untersuchung komplexer Systeme angewendet.^{36–39}

Hydratisiertes Elastin wird mittels quasielastischer Neutronenstreuung untersucht. Die Verwendung von Elastin ist hierbei von besonderer Bedeutung, da es sich im Gegensatz zu anderen Modellproteinen im Temperaturbereich des dynamischen Übergangs aufgrund einer Glasübergangstemperatur $T_g > 300\text{ K}$ bereits in einem glasartigen Zustand befindet.³⁵ Ein dynamischer Übergang (oder auch dessen Fehlen) für dieses Protein liefert daher wertvolle Erkenntnisse über die Interpretation des Übergangs und über unterliegende Modellvorstellungen. Die Untersuchung dieses Systems in einer vorhergehenden Arbeit⁴⁰ war diesbezüglich jedoch nicht eindeutig. Durch einen erweiterten Temperaturbereich sowie durch den Vergleich mit trockenem Elastin wird nun eine bessere Ausgangslage zur Beantwortung dieser Frage geschaffen.

Elastin in reinem Glycerin wird in dieser Arbeit ausführlicher mit Hilfe von ^{13}C -NMR-Spektroskopie auf den Einfluss des Solvatationsgrads auf die Proteindynamik hin

betrachtet. Anhand des beobachteten Einsetzens von Proteinfluktuationen werden so nähere Informationen gewonnen, welche Eigenschaften des Lösungsmittels für die Aktivierung von Proteindynamik von Bedeutung sind.

Für Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen und Lysozym in Wasser-DMSO-Mischungen, liegt das Augenmerk auf der Rolle, die die Zusammensetzung des Lösungsmittels für die Wechselwirkung zwischen Protein und Solvens spielt. So wird einerseits mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie anhand der Elastindynamik der Einfluss der Viskosität auf die Proteindynamik näher beleuchtet. Andererseits wird mit ^2H -NMR-Methoden (und im Fall des Lysozysystems zusätzlich mit dielektrischer Spektroskopie) untersucht, wie der Kontakt mit dem Protein die Lösungsmitteldynamik im Vergleich mit den entsprechenden Bulksystemen beeinflusst. Die Beobachtungen an diesen beiden Proteinen geben somit Informationen, in welchem Ausmaß proteinspezifische Eigenschaften die Lösungsmitteldynamik verändern.

Am Ende dieser Arbeit werden die Befunde der einzelnen Systeme auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin betrachtet. Auf dieser Grundlage werden Annahmen und Voraussagen der unterschiedlichen Modelle kritisch überprüft, um so ein besseres Verständnis für die Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel zu schaffen.

2 GLÄSER UND PROTEINE

Zur Beschreibung und Interpretation der Dynamik in Protein-Lösungsmittel-Systemen werden zahlreiche Begrifflichkeiten aus dem Gebiet glasbildender Systeme verwendet. Die Übernahme der Nomenklatur liegt darin begründet, dass beide Systemklassen ähnliche Eigenschaften zeigen.^{41–46} Bevor daher über Proteine und Lösungsmittel gesprochen wird, folgt zunächst ein kurzer Überblick über die wichtigsten Eigenschaften von Glasbildnern.

2.1 Eigenschaften von glasbildenden Systemen

Über unterkühlte Flüssigkeiten und den Glasübergang gibt es eine Vielzahl an Veröffentlichungen, die sich ausführlich mit diesem Themengebiet auseinandersetzen (z. B. in den Quellen [47–58]). Zahlreiche Modelle wurden über Jahrzehnte hinweg entwickelt, um den Glasübergang zu erklären. Dies beginnt mit der Freien-Volumen-Theorie,⁵⁹ dem Adam-Gibbs-Modell⁶⁰ und dem Energielandschaftsmodell^{61,62} in den sechziger Jahren; Modenkopplungstheorie,⁶³ Random-First-Order-⁶⁴ und Coupling Model^{65,66} in den achtziger und neunziger Jahren hin zu aktuelleren Modellen wie der Elastically-Collective-Nonlinear-Langevin-Equation-Theorie.^{67*}

Definition des
Glasübergangs

Kühlt man eine Flüssigkeit ab, erhöht sich die Viskosität des Systems drastisch. Gelingt es, dabei Kristallisation zu vermeiden, tritt irgendwann der Fall ein, dass die strukturelle Relaxationszeit τ des Systems länger als die experimentelle Zeitskala t_{exp} ist. Das System erscheint von da an festkörperartig, befindet sich jedoch anders als ein kristalliner Zustand in einem Nichtgleichgewichtszustand.⁶⁸ Die Glasübergangstemperatur T_g bezeichnet die Temperatur, bei der dieser Punkt erreicht wird. Wird die Viskosität η als Bezugsgröße betrachtet, wird der Glasübergang bei einem Wert von

$$\eta(T_g) \approx 10^{13} \text{ Poise} = 10^{12} \text{ Pa s.} \quad (2.1)$$

erreicht. Ebenso ist eine Betrachtung struktureller Fluktuationen zur Beschreibung des Glasübergangs möglich. Über die Maxwell-Gleichung

$$\eta(T) = G_0 \tau(T) \quad (2.2)$$

mit dem (schwach temperaturabhängigen) instantanen Elastizitätsmodul G_0 ist die Zeitskala τ der Strukturrelaxation, dem α -Prozess, direkt mit der Viskosität η verknüpft.

* Im Deutschen werden bei Zusammensetzungen überall Bindestriche gesetzt.

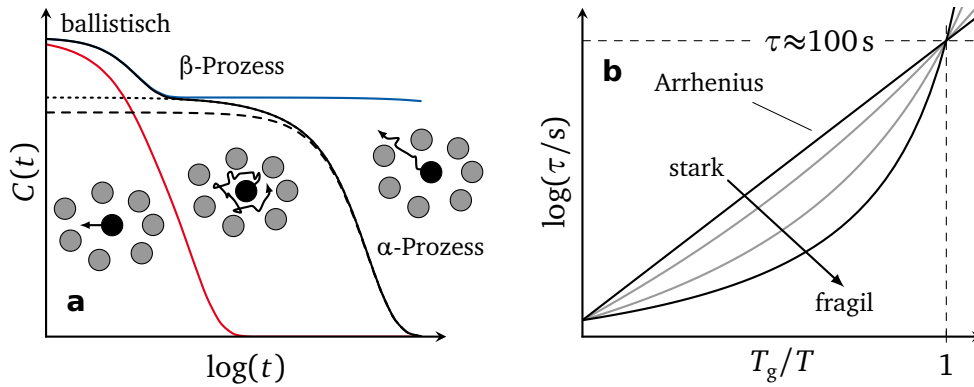


Bild 2.1: (a) Korrelationsabfall im flüssigen Bereich (rot), im unterkühlten Bereich (schwarz) und im Glas (blau): Auf kurzen Zeitskalen bewegen sich Teilchen ballistisch, im intermediären Bereich tritt durch umgebende Teilchen eingeschränkte Bewegung auf (β -Relaxation). Bei ausreichend langen Zeiten kann ein Ausbrechen aus dem Käfig und ein vollständiger Zerfall der Korrelation beobachtet werden (α -Relaxation). (b) Schematische Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit für unterschiedliche Fragilitäten, dargestellt im Angell-Plot^{69,70} ($\log(\tau)$ über T_g/T).

Wird die Zeitabhängigkeit einer Korrelationsfunktion (Abschnitt 3.1) untersucht, kann ein zweistufiger Abfall beobachtet werden (Bild 2.1a). Der erste Abfall im Piko-sekundenbereich wird durch schwach temperaturabhängige Schwingungsbeiträge verursacht. Der zweite größere Abfall wird dem α -Prozess zugeordnet, welcher zu einem vollständigen Korrelationsverlust führt. Zusätzlich können Sekundär- oder β -Prozesse auftreten, die jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Korrelation führen. Sowohl die Schwingungsbewegung als auch der β -Prozess ereignen sich innerhalb eines „Käfigs“ aus anderen Teilchen, während der α -Prozess einem Überwinden des Käfigs entspricht. Im Glaszustand findet auf experimenteller Zeitskala keine Strukturrelaxation statt.

Anhand der Temperaturabhängigkeit der Viskosität und des α -Prozesses unterscheidet man zwischen starken und fragilen Glasbildnern⁷¹ (Bild 2.1b). Als quantitatives Maß für die Fragilität eines Systems wird oft die Steigung am Glasübergang $m = d(\log \tau) / d(T_g/T)$ verwendet. Die Temperaturabhängigkeit starker Glasbildner (z. B. SiO_2 , GeO_2) folgt einem Arrhenius-Verlauf[†]

Temperatur-
abhängigkeit

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{E_A}{k_B T}\right). \quad (2.3)$$

[†] Benannt nach Svante Arrhenius (* 1859, † 1927).

Dessen Steigung in der Arrheniusdarstellung ($\log \tau$ über $1/T$) ist durch die Aktivierungsenergie E_A bestimmt. Fragile Systeme (z. B. *o*-Terphenyl,⁶⁹ Polycarbonat⁷²) zeigen ein Super-Arrhenius-Verhalten, das oft durch die Vogel-Fulcher-Tammann(VFT)-Gleichung^{73–75}

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{B}{T - T_0}\right) \quad (2.4)$$

beschrieben werden kann, wobei auch andere Parametrisierungen Anwendung finden.^{76–79} Die Abweichung vom Arrheniusverhalten lässt sich so erklären, dass die Überwindung des Käfigs gleichzeitig eine Umordnung der benachbarten Teilchen erfordert und damit ganze Molekülcluster eine kooperative Bewegung durchführen. Eine mit sinkender Temperatur zunehmende Clustergröße, wie sie z. B. in der Adam-Gibbs-Theorie postuliert wird, führt dann zu einer stärker werdenden Temperaturabhängigkeit und zum beobachteten Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten.

α -Prozess Die Zeitabhängigkeit des α -Prozesses einfacher Glasbildner kann meist über die Kohlrausch-Williams-Watts(KWW)-Funktion^{80,81}

$$C(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right] \quad (2.5)$$

beschrieben werden. Die Nichtexponentialität β und die spektrale Form des α -Prozesses ändern sich häufig nur wenig bei Variation der Temperatur und das Prinzip der Zeit-Temperatur-Superposition lässt sich anwenden.⁸² Der nichtexponentielle Abfall lässt sich mathematisch als Überlagerung von Abfällen mit einer intrinsischen Nichtexponentialität β_{in}

$$\exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right] = \int_0^\infty g(\tau_{\text{in}}) \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_{\text{in}}}\right)^{\beta_{\text{in}}}\right] d\tau_{\text{in}} \quad (2.6)$$

schreiben, deren Abfallzeiten τ_{in} einer Verteilung $g(\tau_{\text{in}})$ gehorchen.⁸³ Diese Beschreibung hat als Grenzfälle den heterogenen Fall, der einer Verteilung exponentieller Prozesse entspricht ($\beta_{\text{in}} = 1$), und den homogenen Fall, in dem keine Verteilung auftritt [$g(\tau_{\text{in}}) = \delta(\tau_{\text{in}} - \tau)$], jedoch eine systemimmanente Nichtexponentialität existiert ($\beta_{\text{in}} = \beta$). Experimentelle sowie Simulationsergebnisse legen aber nahe, dass in unterkühlten Flüssigkeiten dynamische Heterogenitäten vorhanden sind,^{83–86} sodass von einer Verteilung von Korrelationszeiten ausgegangen werden kann.

Sekundärprozesse Zusätzlich zum α -Prozess können verschiedene Sekundärprozesse[‡] auftreten. Neben intramolekularen Bewegungsmoden, beispielsweise durch Seitenketten, ist hier der Johari-Goldstein(JG)- β -Prozess zu erwähnen.⁸⁷ Die Temperaturabhängigkeit von

[‡] Unabhängig von der Ursache dieser Prozesse wird im Folgenden synonym auch der Begriff β -Prozess benutzt.

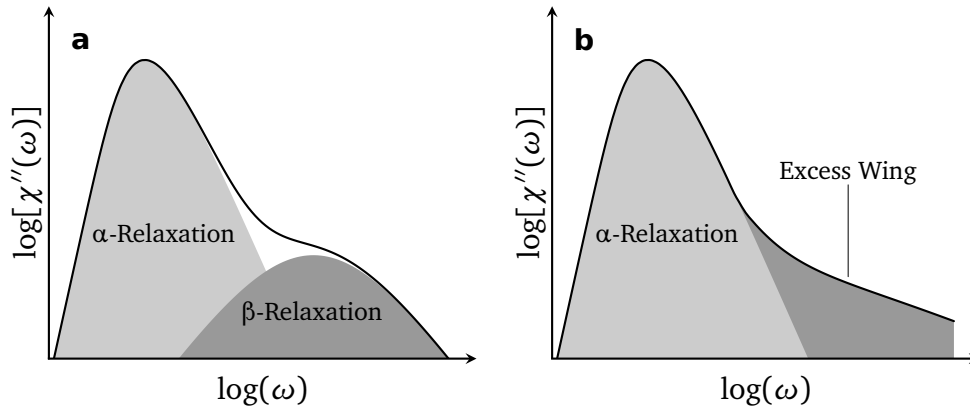


Bild 2.2: Glasbildende Systeme in der Suszeptibilitätsdarstellung: (a) Systeme mit getrennt beobachtbaren β -Prozess, (b) Systeme mit Excess Wing.

Sekundärprozessen folgt oft einem Arrheniusverlauf. Die Breite der unterliegenden Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ nimmt mit sinkender Temperatur zu. Aber auch wenn kein zusätzlicher β -Prozess vorhanden ist, kann u. a. in dynamischen Suszeptibilitäten $\chi''(\omega)$ (z. B. in der dielektrischen Spektroskopie) bei Abkühlung ein zusätzlicher Intensitätsbeitrag auf der Hochfrequenzflanke beobachtet werden, der sog. Excess Wing (EW, Bild 2.2b). Ob der Excess Wing ein eigenständiger Relaxationsprozess ist, der vom α -Prozess überdeckt wird oder eine andere Erklärung herangezogen werden muss, ist bisher noch nicht vollständig geklärt.^{88–91}

Jenseits der Signalbeiträgen von β -Prozessen folgt die Suszeptibilität bei Temperaturen $T \ll T_g$ einem Potenzgesetz $\chi''(\omega) \propto \omega^\gamma$ mit Exponenten $\gamma \ll 1$. Die Amplitude dieses „Nearly Constant Loss“ (NCL) steigt exponentiell mit der Temperatur.⁹² Als mögliche Interpretationen werden der NCL als Ausläufer eines β -Prozesses⁹³ oder als separater Prozess, der dem α -Prozess vorgelagert ist,^{94,95} diskutiert.

Der Glasübergang und die Glasübergangstemperatur wirkt sich auch auf Messgrößen aus, die nicht direkt den α -Prozess beobachten. Die folgende Auflistung umfasst nur Größen, die für diese Arbeit relevant sind: Durch die Änderung in der Zahl verfügbarer Freiheitsgrade führt Überschreiten von T_g zu einer Stufe in der Wärmekapazität⁴⁴ (Bild 2.3c).

Messgrößen

Das mittlere Verschiebungsquadrat in experimentellen Methoden wie Neutronenstreuung oder Mößbauerspektroskopie, die auf der Zeitskala von 10^{-12} s bis 10^{-9} s sensitiv sind, weist bei Durchlaufen der Glasübergangstemperatur eine Änderung der Temperaturabhängigkeit auf⁵¹ (Bild 2.3d). Im unterkühlten Zustand finden auf dieser Zeitskala lokale Prozesse innerhalb des Molekülkäfigs statt (Plateaubereich in Bild 2.1a). Der Übergang im mittleren Verschiebungsquadrat wird auf zusätzliche anharmonische Dynamik zurückgeführt.⁵¹

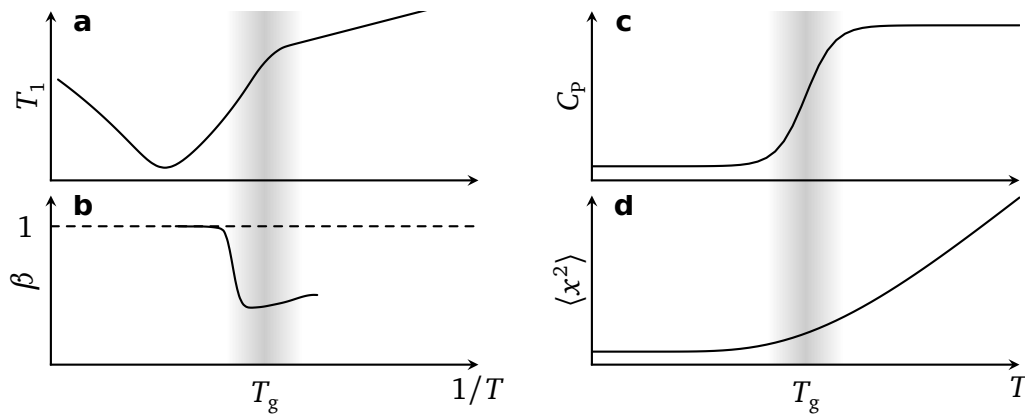


Bild 2.3: Effekte des Glasübergangs auf experimentelle Größen: (a) Änderung der Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 , (b) nicht-exponentieller Magnetierungsaufbau ($\beta < 1$), (c) Stufe in der Wärmekapazität C_p , (d) stärkerer Anstieg des mit Neutronenstreuung beobachteten mittleren Verschiebungsquadrats $\langle x^2 \rangle$.

In der Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 tritt am Glasübergang eine Änderung der Temperaturabhängigkeit auf (Bild 2.3a) und ein nichtexponentieller Magnetisierungsaufbau wird etwas oberhalb der Glasübergangstemperatur beobachtet (Bild 2.3b).⁵³ Beide Beobachtungen der NMR-Spektroskopie lassen sich darauf zurückführen, dass bei hohen Temperaturen auf der Zeitskala der Spin-Gitter-Relaxationszeit (für die hier genutzte ^2H -NMR im Bereich von 1 ms bis 1 s) der deutlich schnellere α -Prozess über Verteilungen von Relaxationszeiten $V(T_1)$ mittelt und Ergodizität herstellt. Bei Annäherung an den Glasübergang verlangsamt der α -Prozess so weit, dass diese Mittelung nicht mehr möglich ist, und ein nichtexponentieller Magnetierungsaufbau wird beobachtet. Zusätzlich können nun lokale Prozesse, die keine Ergodizität herstellen, die Relaxation bestimmen und die Temperaturabhängigkeit ändern,

2.2 Proteine

Die Funktionalität und Dynamik sind in Proteinen eng miteinander verknüpft.^{4,96–98} Im Allgemeinen wird angenommen, dass Proteindynamik die Anwesenheit eines Lösungsmittels, meist Wasser, voraussetzt.^{4,99–101} Es existieren aber auch Untersuchungen, in denen Aktivität ohne Lösungsmittel festgestellt wurde.^{102–104} Die Informationen, die in diesem Abschnitt gegeben werden, beziehen sich meist auf hydratisierte Proteine. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass sich die Forschung sowohl zum Lösungsmittel als auch zum Protein zu einem großen Teil auf diese Systeme konzentriert ist.^{4,7,105–111}

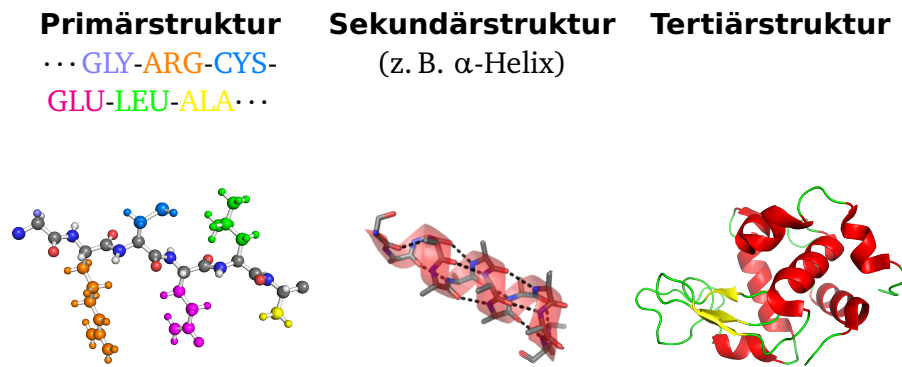


Bild 2.4: Struktureinheiten von Proteinen: Ausschnitt aus der Primärstruktur von Lysozym (Atome: C–schwarz, O–rot, N–blau, H–weiß), Seitenketten sind farblich hervorgehoben; Sekundärstruktur: α -Helix der dargestellten Primärstruktur (ohne Seitenketten) mit Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Rückgrats als gestrichelte Linien; Tertiärstruktur von Lysozym (rot: α -Helix, gelb: β -Faltblatt).

Bevor aber über die Dynamik in Proteinen gesprochen wird, soll zunächst deren Aufbau erklärt werden, da die Struktur des Proteins dessen Funktion maßgeblich beeinflusst.¹¹² Proteine sind Makromoleküle aus proteinogenen Aminosäuren (aufgelistet in Tabelle D.2), die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Primärstruktur gibt die Reihenfolge der Aminosäuren innerhalb der Peptidkette vor. Anders als normale Polymere, die ebenfalls aus einer Aneinanderreihung von Monomerbausteinen bestehen, treten durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen Sekundärstrukturen über mehrere Aminosäuren hinweg auf. Diese Strukturen sind wiederum innerhalb des Gesamtmoleküls in der Tertiärstruktur angeordnet und bilden den nativen Zustand des Proteins. Die korrekte Faltung in diesen Zustand ist wichtig, deren Fehlen wird im menschlichen Körper mit Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson in Verbindung gebracht.^{113,114} Das Protein ist in seiner Tertiärstruktur jedoch nicht starr, sondern bewegt sich zwischen verschiedenen, fast isoenergetischen Konformationszuständen.^{115–117}

Protein-
struktur

Wie bereits zu Beginn des Kapitels erwähnt, ähneln sich Proteine und glasbildende Systeme. Dies beginnt auf struktureller Ebene, wie der Vergleich von Paarverteilungsfunktionen verdeutlicht (Bild 2.5a). Sowohl um die Moleküle von Flüssigkeiten/Gläsern als auch um die einzelnen Aminosäuren eines Proteins existiert Ordnung nur in der unmittelbaren Umgebung. Auf größeren Längenskalen ist eine isotrope Verteilung der Atome zu beobachten.

Vergleich
Protein-Glas

Eine weitere Parallele, die zwischen Proteinen in Lösungsmitteln und Gläsern gezogen wurde, ist die Beobachtung eines Glasübergangs des Proteins in kalorimetrischen

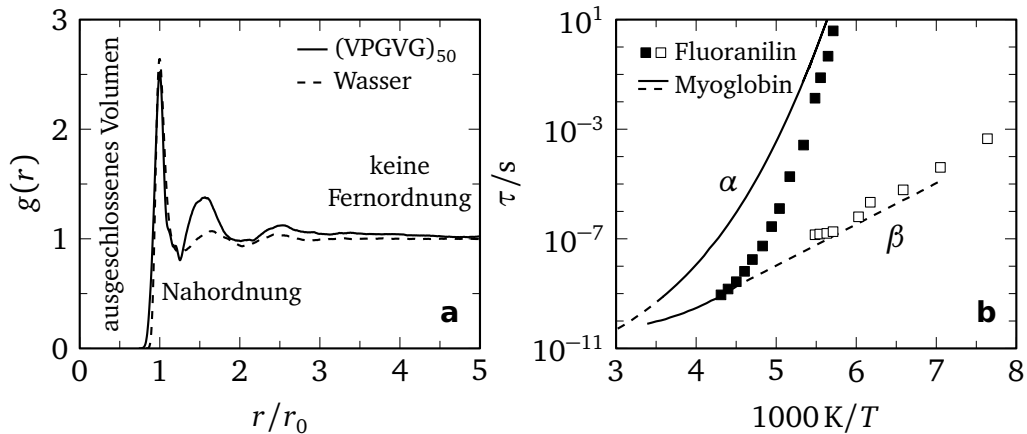


Bild 2.5: (a) Paarverteilungsfunktion $g(r)$ der Sauerstoffatome von Wasser und des Masseschwerpunkte der Aminosäuren des elastinähnlichen Peptids $(VPGVG)_{50}$,⁴⁰ jeweils skaliert auf den Abstand zum nächsten Nachbarn r_0 . (b) α - (gefüllte Symbole) und β -Prozess (offene Symbole) in Fluoranthin⁹² mit analogen Prozessen in Myoglobin (durchgezogene Linien: Messdaten, gestrichelte Linien: Extrapolationen).⁴⁵

Messungen.^{17,28,35,118–120} Dieser Glasübergang spielt auch für die Interpretation des dynamischen Übergangs der quasilastischen Neutronenstreuung eine Rolle, auf den auf Seite 13 eingegangen wird. Anhand von Relaxationsprozessen in Myoglobin wurden großamplitudige Bewegungen des Proteins und lokale Bewegungen u. a. aufgrund ihrer Temperaturabhängigkeit in Analogie zum α - bzw. β -Prozess interpretiert⁴⁵ (Bild 2.5b).

Die Gemeinsamkeiten zwischen Protein und Glas haben dazu geführt, dass Modelle zur Beschreibung unterkühlter Flüssigkeiten/Gläser auch auf Proteinsysteme angewandt werden. Ein Beispiel ist die Modenkopplungstheorie, mit deren Hilfe der Abfall der intermediären Streufunktion von Proteinen im Pikosekundenbereich reproduziert werden kann.^{46,121} Ein weiteres ist das Modell der Energielandschaft,^{61,117} anhand dessen häufig die Diskussion der Protein-Lösungsmittel-Dynamik stattfindet. Die Landschaft ist hierarchisch aufgebaut^{108,117} (Bild 2.6): Je niedriger die Übergänge in der Hierarchie sind, umso geringer ist die benötigte Energie für eine Zustandsänderung und umso höher ist deren Übergangsrate. Die höchste Stufe repräsentiert Übergänge zwischen unterschiedlichen funktionalen (taxonomischen) Proteinzuständen.¹²² Innerhalb des Konformationsraums eines Zustands befinden sich zwei weitere Ebenen[§] mit einer hohen Anzahl an Energiebarrieren, die einer statistischen Beschreibung bedürfen. Trotz seiner Eingängigkeit wird gelegentlich

Energieland-
schaft

[§] Es können noch mehr Ebenen (z. B. Bindungsschwingungen) unterhalb der gezeigten auftreten,¹²³ die für diese Arbeit aber nicht relevant sind.

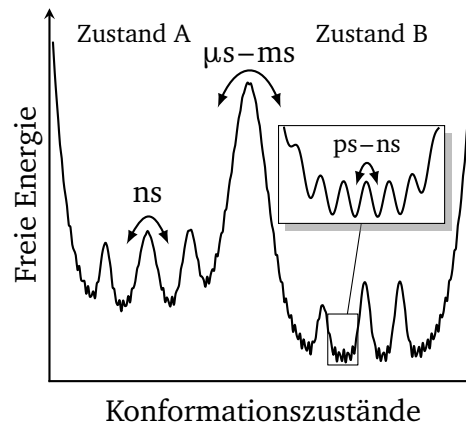


Bild 2.6: Hierarchischer Aufbau der freien Energielandschaft in Proteinsystemen^{108,117} mit typischen Zeitskalen bei Raumtemperatur, Nebenbild zeigt vergrößert die unterste Hierarchiestufe.

am Energielandschaftsmodell für Proteine die Kritik geübt, dass es statisch ist und Fluktuationen der Energiebarrieren durch das Lösungsmittel vernachlässigt werden.^{22,23}

Die Aktivierung der Proteindynamik mit steigender Hydratation lässt sich, wie von Rupley und Careri beschrieben, in eine Reihe von Schritten unterteilen:^{4,5} Wird der Hydratationsgrad auf $h \approx 0,1 - 0,2$ [†] erhöht bilden sich Wassercluster um polare und geladene Seitengruppen,^{5,124} und Librationsbewegung sind möglich.¹²⁵ Vollständiges Einsetzen aller dynamischen Prozesse wird häufig für Hydratationsgrade $h \approx 0,3 - 0,4$ beobachtet.

Umgekehrt wird auch die Struktur und Dynamik des umgebenden Lösungsmittels durch das Protein beeinflusst. Der Einfluss des Proteins ist jedoch auf einige Ångström beschränkt und wirkt sich nur auf die ersten ein bis zwei Monolagen Wasser aus.^{107,128} In diesem Bereich ist ein Gefrieren des Wasser unterdrückt.^{119,129–131} Die lokale Dichte des Lösungsmittels ist um mehrere Prozent erhöht.^{132–134} Die Lösungsmitteldynamik wird umso langsamer, je geringer der Abstand zur Proteinoberfläche ist, wie Molekulardynamiksimulation zeigen (Bild 2.7a).¹²⁶ Die Stärke der Verlangsamung ist im Detail aber von der lokalen Umgebung abhängig.^{135,136} Wird über diese Umgebungen gemittelt, wird eine schwache Verlangsamung der Dynamik und eine Verbreiterung der Verteilung festgestellt,^{7,137–140} wie das Beispiel von Glycerin an Collagen in Bild 2.7b zeigt.

Lösungsmittel-
dynamik

[†]Die Angaben beziehen sich auf h Gramm Wasser (oder allgemeiner auf s Gramm Solvens) pro Gramm trockenes Protein. Wie häufig in der Literatur wird auf die Angabe der Einheit jedoch verzichtet.

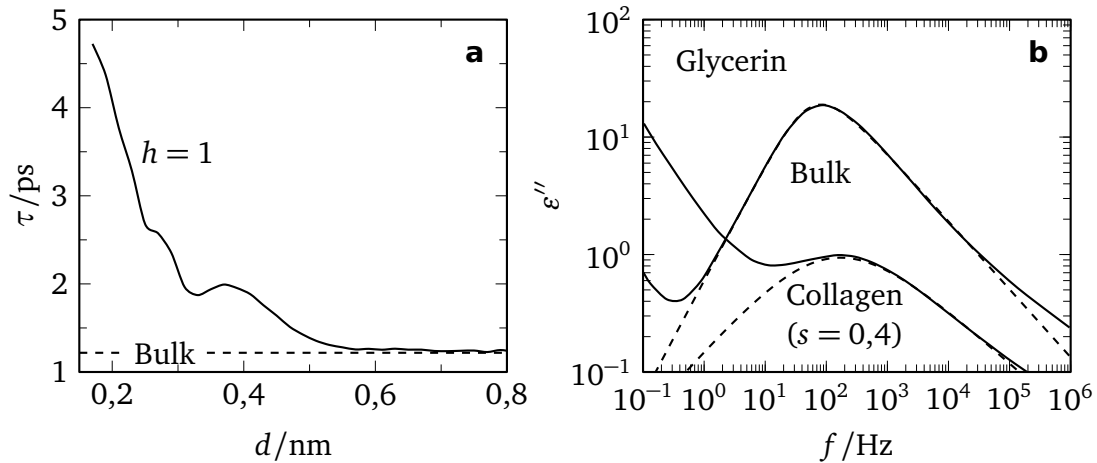


Bild 2.7: (a) Wasserdynamik in Abhängigkeit vom Abstand d zur Proteinoberfläche,¹²⁶ (b) dielektrischer Verlust von Glycerin im Bulksystem und an Collagen.¹²⁷

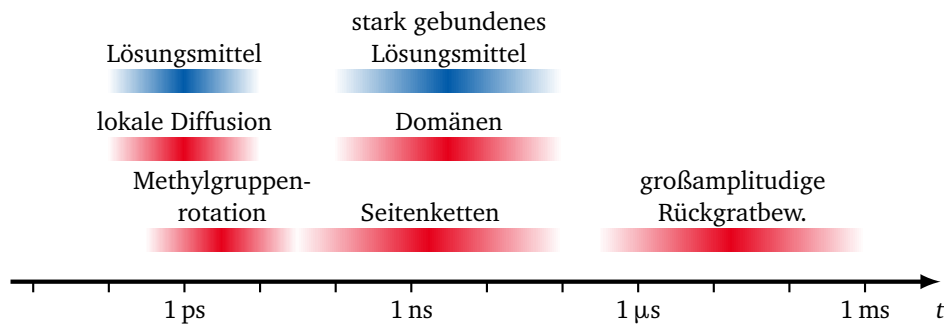


Bild 2.8: Übersicht über dynamische Prozesse in Protein-Lösungsmittel-Systemen bei Raumtemperatur.¹⁰⁹

Dynamische
Prozesse

Wie das Bild der Energielandschaft bereits andeutet, finden im Protein verschiedene dynamische Prozesse auf unterschiedlichen Zeitskalen gleichzeitig statt (Bild 2.8): Im Subpikosekundenbereich^{||} treten Bindungsschwingungen auf, die jedoch für diese Arbeit keine Rolle spielen und hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Auf einer längeren Zeitskala von etwa 10^{-11} s treten Methylgruppenrotationen auf. Die Temperaturabhängigkeit ist ein Arrheniusverhalten mit nur niedrigen Energiebarrieren ($E \approx 0,16$ eV).^{101,141,142} Methylgruppendynamik wird auch bei fehlendem Lösungsmittel und tiefen Temperaturen beobachtet.^{101,143–145}

^{||} Die genannten Zeitskalen entsprechen der Zeitskala der jeweiligen Dynamik bei Raumtemperatur.

Auf der gleichen Zeitskala ist die Dynamik des Lösungsmittels zu beobachten.^{16,146,147} In Molekulardynamiksimulationen und Neutronenstreuexperimenten wurde ebenfalls ein stark gestreckter dynamischer Prozess des Proteins gefunden.^{109,121,148–150} Die Bewegungsamplitude der Fluktuation ist auf wenige Ångström in einem lokalen Potential beschränkt, weshalb der Begriff „localized diffusion“ als Gegensatz zur diffusiven Bewegung des Lösungsmittels verwendet wird.¹⁰⁹ Diese Fluktuationen umfassen dabei alle Bereiche des Proteins, Seitenketten und Rückgrat.¹⁵¹ Molekulardynamiksimulationen legen eine Kopplung des Lösungsmittel- und der lokalen Proteindiffusion nahe.^{126,152}

Konformationsänderungen durch Bewegungen von Seitengruppen oder Proteindomänen werden meist als Ursache für Dynamik auf der Zeitskala einiger Nanosekunden genannt.^{17,119,125,153,154} Es gibt aber auch Stimmen, die einen Beitrag durch stark gebundenes Lösungsmittel (z. B. im Proteininneren) als Möglichkeit in Betracht ziehen.¹⁵³ Die Temperaturabhängigkeit des Prozesses folgt der des Lösungsmittels, ist allerdings um mehrere Größenordnungen langsamer.^{17,27,155} Es wird eine starke Abhängigkeit der Dynamik vom Solvatationsgrad und der Viskosität beobachtet.^{8,17,154,156} NMR-Untersuchungen konnten zeigen, dass die Bewegungsamplitude bei Zugabe von Lösungsmittel vergrößert wird.^{125,145,157}

NMR-Relaxationsmessungen und Simulationen zeigen Hinweise darauf, dass auf einer Zeitskala von Mikrosekunden großamplitudige Dynamik des Proteinerückgrats auftreten kann.^{158–161} Diese Bewegungen erlaubt es dem Protein zwischen unterschiedlichen Konformationszuständen zu wechseln. In dielektrischer Spektroskopie wurde ebenfalls ein Relaxationsprozess auf dieser Zeitskala beobachtet, der aufgrund seiner Temperaturabhängigkeit als mögliche Ursache des Glasübergangs der untersuchten Systeme vorgeschlagen wurde.^{25,109,155}

2.3 Modelle zur Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel

Obwohl eine Kopplung zwischen Lösungsmittel und Protein beobachtet wird und das Lösungsmittel die Proteindynamik zumindest fördert, fehlt eine vollständige Beschreibung der Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten. Bei wasserstoffbrückenbildenden Systemen spielt das ausgebildete Netzwerk eine Rolle,^{152,162} aber auch hier ist die Frage nach dem Mechanismus noch nicht endgültig beantwortet. Auch für andere Arten an Lösungsmittel fehlen umfassende Erklärungen und Modelle. Im Folgenden werden die wichtigsten Erklärungsansätze für die Wechselwirkung zwischen Protein und Solvens dargestellt.

Diese Modelle werden häufig anhand des Auftretens dynamischer Übergänge, d. h. einer Änderung der Temperaturabhängigkeit der beobachteten Größen, diskutiert. In verschiedenen spektroskopischen Methoden (u. a. ESR,¹⁶⁴ NMR,^{145,165} IR,^{166,167}

Dynamischer Übergang

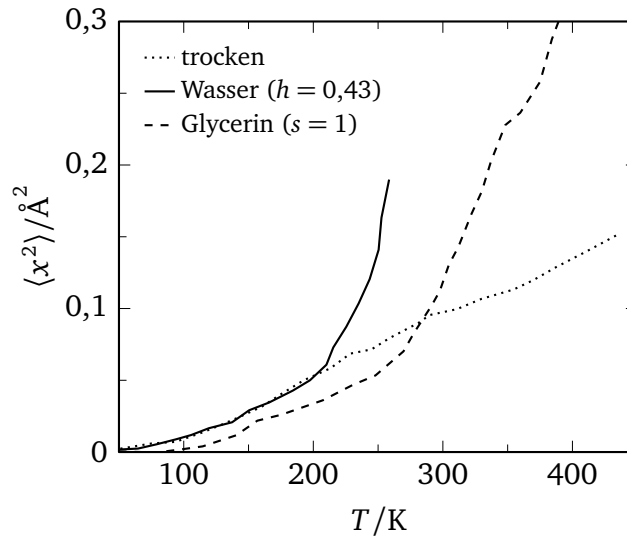


Bild 2.9: Mittleres Verschiebungsquadrat auf Nanosekundenzeitskala von Lysozym in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.¹⁶³

THz¹⁶⁸ und dielektrische Spektroskopie¹⁶⁹) werden solche Übergänge in der Proteindynamik festgestellt. Der am häufigsten in der Literatur diskutierte Übergang ist die Änderung des mittleren Verschiebungsquadrats bei 180 K bis 240 K (Bild 2.9) in Mößbauer-Spektroskopie, Neutronenstreuung und Simulationen, die auf Dynamik im Piko- bis Nanosekundenbereich sensitiv sind.^{15,25,29,170–172} Dieser Übergang wurde in trockenen Proteinen nicht beobachtet, sodass er als Folge der Anwesenheit des Lösungsmittels interpretiert wurde. Aktuellere Untersuchungen berichten einen solchen Übergang aber auch in trockenen Systemen.^{173,174} Neutronenstreuung und Simulationen zeigen, dass der Übergang ein Folge des Einsetzens anharmonischer Bewegungen ist.^{101,141} Das Auftreten von Translationsbewegung des Lösungsmittels auf der experimentellen Zeitskala hängt mit dem dynamischen Übergang zusammen, wie mittels Neutronenstreuung gezeigt werden konnte.¹⁷⁵ Bild 2.9 zeigt zudem den Befund, dass die Viskosität des Lösungsmittels Ausprägung und Temperatur des dynamischen Übergangs beeinflusst.^{138,162} Die Temperatur des dynamischen Übergangs scheint zudem von der zeitlichen Auflösung des Experiments abzuhängen.^{176–178} Wurde zunächst nur ein Übergang beobachtet, finden sich in jüngerer Zeit Studien, die stattdessen zwei Übergänge in diesem Temperaturbereich vorschlagen.^{23,26} Durch Untersuchung der Abhängigkeit des dynamischen Übergangs von der Struktur des Proteins wurde festgestellt, dass sowohl Seitenketten- als auch Rückgratatome dazu beitragen.^{141,179} Zusätzliches Interesse am dynamischen Übergang rührt daher, dass im Temperaturfenster, in dem er auftritt, auch vom Einsetzen der Proteinaktivität berichtet wird.^{29,30,180,181} Aufgrund von Untersuchungen, die Proteinaktivität unterhalb des Übergangs beobachten,^{96,182–184} ist jedoch

nicht zwingend von einem universellen Zusammenhang zwischen Aktivität und Dynamik auszugehen. Auch für den dynamischen Übergang gibt es bisher keine eindeutige Klärung der Ursachen, Ansätze dazu folgen jedoch aus den Modellen zur Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung.

Im „Slaving“-Modell¹⁰⁶ von Frauenfelder et al. werden Fluktuationen im Protein erst durch das umgebende Lösungsmittel ermöglicht:^{45,185} Die α -Fluktuationen, d. h. großamplitudige Bewegungen des Proteins auf der mittleren Ebene der Energielandschaft, folgen dem α -Prozess des Bulk-Lösungsmittels und sind an die Viskosität des Lösungsmittels gekoppelt. Bei zu niedrigen Solvationsgraden, z. B. bei Abwesenheit des Lösungsmittels, ist das Protein nicht in der Lage, diese Fluktuationen durchzuführen. Aufgrund seiner starken Abhängigkeit vom Lösungsmittel werden die α -Fluktuationen als „solvent slaved“ bezeichnet.⁴⁵ Kleinamplitudige Fluktuationen in der untersten Ebene der Energielandschaft sind an die Hydratationshülle des Proteins gekoppelt. Diese Prozesse sind dabei durch den β_h -Prozess des Lösungsmittels bestimmt. Der β_h -Prozess entspricht nicht zwingend dem β -Prozess des Bulk-Solvens, ist aber unabhängig von der Viskosität des Lösungsmittels. Andererseits existieren Untersuchungen, in denen eine gegenseitige Beeinflussung von Lösungsmittel und Protein anstelle einer einseitigen Abhängigkeit festgestellt wurde.^{20,164,186} Der dynamische Übergang wird in diesem Modell damit erklärt, dass der β_h -Prozess die experimentelle Zeitskala kreuzt.¹⁸ Das mittlere Verschiebungsquadrat des Proteins steigt demnach mit dem Anteil an Fluktuationen des Lösungsmittels an, die auf dieser Zeitskala schnell erscheinen.

Slaving-
Modell

Ein anderer Ansatz sieht das Lösungsmittel als Weichmacher, der die Flexibilität des Proteins ermöglicht.^{187–190} Der Effekt des Lösungsmittels, wie er auch für Polymere beobachtet wird,¹⁹¹ beruht auf der Abschirmung von Wechselwirkungen polarer Seitengruppen. Die gemeinsame Temperaturabhängigkeit von Lösungsmittel- und Proteinprozessen folgt aus der Ausbildung eines gemeinsamen Wasserstoffbrückennetzwerks, das beide Komponenten verbindet.¹⁹⁰ Von Doster, der diese Erklärung unterstützt, werden zwei Übergänge im mittleren Verschiebungsquadrat erwartet:^{23,192} Der erste Übergang tritt auflösungsunabhängig bei der Glasübergangstemperatur T_g des Lösungsmittels auf. An diesem Punkt vergrößert sich die Amplitude schneller Fluktuationen von Wasserstoffbrücken, die eine größere Beweglichkeit des Proteinsystems verursacht. Damit einhergehend ändert sich die Temperaturabhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats. Ein zweiter Übergang bei $T_d > T_g$ wird von Doster mit dem Kreuzen der Relaxationszeit des α -Prozesses des Lösungsmittels und der experimentellen Zeitfenster begründet.

Lösungsmittel als
Weichmacher

Für Ngai et al. ist die Dynamik von Proteinsystemen eine von vielen Systemklassen, die durch das Coupling-Modell beschrieben werden können.^{65,66} Der Name des

Coupling-
Modell

Modells liegt darin begründet, dass der α -Prozess über

$$\tau_\beta = \tau_\alpha^{1-n} t_c^n \quad (2.7)$$

an eine primitive Relaxation koppelt, die in der Regel mit dem JG- β -Prozess identifiziert wird. Der Kopplungsparameter n ist verknüpft mit der Nichtexponentialität $\beta = 1 - n$ des α -Prozesses, t_c beschreibt den Übergang zwischen primitiver und struktureller Relaxation.⁶⁵ In wasserhaltigen Systemen wie hydratisierten Proteinen übernimmt der Wasserprozess die Rolle des primitiven Prozesses.^{24,25,65,193} In der Erklärung von Ngai et al. werden für hydratisierte Proteine ebenfalls mehrere Änderungen des mittleren Verschiebungsquadrats postuliert.^{25,174,193} Eine Änderung wird bei der Glasübergangstemperatur des α -Prozesses $T_{g\alpha}$ des Proteins erwartet. Anders als in der Interpretation von Doster sind nicht größere Fluktuationen des Wasserstoffbrückennetzwerks die Ursache, sondern eine erhöhte Relaxationsstärke des Nearly Constant Loss als Grund für die Übergänge zu sehen. Der zweite Übergang bei T_d wird in diesem Modell auf das Eintreten der JG- β -Relaxation des Lösungsmittel in das experimentelle Zeitfenster zurückgeführt. Obwohl somit im dynamischen Übergang von Doster und Ngai für hydratisierte Proteine ein Übergang auf das Kreuzen der beobachteten Korrelationszeit des Hydratwassers und der experimentellen Zeitskala erwartet wird, unterscheiden sich beide grundlegend darin, wie diese Dynamik interpretiert wird. Für Doster entspricht die beobachtete Dynamik der Strukturrelaxation des Wassers am Protein,²³ von Ngai hingegen wird dieser Prozess als JG- β -Prozess des Bulkwassers gedeutet.²⁴

Flüssig-Flüssig-
Phasenübergang

Eine weiterer Ansatz, den dynamischen Übergang zu erklären, folgt aus der Annahme, dass Wasserdynamik bei $T = 225$ K einen Fragil-Stark-Übergang in der Temperaturabhängigkeit vollzieht.¹⁹⁴ Diesem Modell liegt die Überzeugung zugrunde, dass Wasser einen Flüssig-Flüssig-Phasenübergang von einer hochdichten (HDL) zu einer niedrigdichten (LDL) flüssigen Wasserphase durchführt.¹⁹⁵ Dieser Übergang ändert die Temperaturabhängigkeit der Strukturrelaxation des Wassers bei $T = 225$ K von einem fragilen Vogel-Fulcher-Tammann- zu einem starken Arrheniusverhalten.¹⁹⁶ Die Änderung der Temperaturabhängigkeit wird in verschiedenen Experimenten und Simulationen gefunden.^{120,197–199} Andererseits existieren dem widersprechende Untersuchungen, die keinen Übergang finden.^{16,23,154,200,201}

Eigenschaften von Proteinsystemen außerhalb des Fokus der Arbeit

Durch die Verwendung geringer Solvatationsgrade und die Konzentration auf interne Proteindynamik bzw. Lösungsmitteldynamik, gibt es Aspekte, die in dieser Arbeit nicht diskutiert werden können: Dies betrifft in erster Linie die mögliche Entmischung mehrkomponentiger Lösungsmittel an der Proteinoberfläche und deren

Folgen. Der Effekt der „preferential hydration“ ist bedeutsam für die strukturelle Stabilität.^{13,202,203} Die hier verwendeten Solvatationsgrade entsprechen jedoch nur ein bis zwei Monolagen Lösungsmittel um das Protein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine Entmischung stattfinden kann. Die Zusammensetzung des Lösungsmittels hat auch Auswirkungen auf die Stabilität, Struktur und Faltung des Proteins, wie in Proteinlösungen beobachtet werden konnte.^{204,205} Da hier jedoch nur Einflüsse auf Dynamik im bereits gefalteten Zustand des Proteins untersucht werden, werden mögliche Wechselwirkung auf diesem Gebiet nicht weiter verfolgt.

3 METHODISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Korrelationsfunktion und Suszeptibilität

Die spektroskopischen Methoden magnetische Kernspinresonanz (NMR), quasielastische Neutronenstreuung (QENS) und dielektrische Spektroskopie (DS), die in dieser Arbeiten verwendet wurden, beruhen auf der Beobachtung einer Korrelationsfunktion einer stochastisch fluktuierenden Größe f ²⁰⁶ in der Zeit

$$C(t) = \frac{\langle f(0)f(t) \rangle}{\langle f^2(0) \rangle} \quad (3.1)$$

oder in Raum und Zeit

$$C(\mathbf{r}, t) = \frac{\langle f(\mathbf{0}, 0)f(\mathbf{r}, t) \rangle}{\langle f^2(\mathbf{0}, 0) \rangle}. \quad (3.2)$$

Diese Funktionen messen die Korrelation zwischen den Zeitpunkten 0 und t bzw. diesen Zeitpunkten und den Positionen $\mathbf{0}$ und \mathbf{r} , gemittelt über das beobachtete Ensemble (dargestellt durch Notation $\langle \dots \rangle$).

Die in dielektrischer und NMR-Spektroskopie beobachtete molekulare Reorientierung kann über eine Rotationsautokorrelationsfunktion

$$F_l(t) = \frac{\langle P_l[\cos \theta(0)]P_l[\cos \theta(t)] \rangle}{\langle P_l[\cos \theta(0)]^2 \rangle} \quad (3.3)$$

beschrieben werden. Der Winkel θ , der im Argument des Legendre-Polynoms l -ter Ordnung P_l auftritt, kodiert hierbei die molekulare Orientierung.

Die Korrelationsfunktion der dielektrischen Spektroskopie ist unter der Annahme linearer Antwort und bei Vernachlässigung von Kreuzkorrelationen durch die Reorientierung der elektrischen Dipole im angelegten elektrischen Feld \mathbf{E} ²⁰⁷

$$C_{DS}(t) = \frac{\langle \boldsymbol{\mu}(0) \cdot \boldsymbol{\mu}(t) \rangle}{\mu^2} \sim \langle P_1[\cos \theta_{DS}(0)] \cdot P_1[\cos \theta_{DS}(t)] \rangle \equiv F_1(t) \quad (3.4)$$

gegeben, wobei $\theta(t)$ der Winkel zwischen Dipol und äußerem Feld \mathbf{E} ist. Analog dazu führt in der NMR die Reorientierung eines Wechselwirkungstensors zweiten Ranges bezüglich des äußeren Magnetfelds \mathbf{B} zur Korrelationsfunktion

$$C_{NMR}(t) = \frac{\langle P_2[\cos \theta_{NMR}(0)] \cdot P_2[\cos \theta_{NMR}(t)] \rangle}{\langle P_2[\cos \theta_{NMR}(0)]^2 \rangle} \equiv F_2(t). \quad (3.5)$$

Während dielektrische Spektroskopie und NMR aufgrund ihrer Korrelationsfunktio-

nen Rotationsbewegung detektieren und rein zeitliche Korrelationen messen, ist in der Neutronenstreuung die zugrunde liegende Korrelationsfunktion die Van-Hove-Korrelationsfunktion

$$C_{\text{NS}}(\mathbf{r}, t) = \frac{\langle \rho(\mathbf{0}, 0) \rho(\mathbf{r}, t) \rangle}{\langle \rho^2(\mathbf{0}, 0) \rangle}, \quad (3.6)$$

die auf Dichtefluktuationen sowohl im Raum als auch in der Zeit reagiert. Die durch räumliche Fouriertransformation gewonnene intermediäre Streufunktion²⁰⁸

$$C_{\text{NS}}(\mathbf{q}, t) = \langle \exp \{i\mathbf{q}[\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)]\} \rangle \equiv I(\mathbf{q}, t) \quad (3.7)$$

ist andererseits eine rein zeitliche Korrelationsfunktion, da der Streuvektor \mathbf{q} als experimenteller Parameter festgesetzt wird.

Durch Fouriertransformation erhält man in der dielektrischen Spektroskopie und NMR spektrale Dichten

$$J_l(\omega) = \int_0^\infty F_l(t) e^{-i\omega t} dt \quad (3.8)$$

und in der Neutronenstreuung den dynamischen Strukturfaktor

$$S(\mathbf{q}, \omega) = \int_{-\infty}^\infty I(\mathbf{q}, t) e^{-i\omega t} dt. \quad (3.9)$$

Diese lassen sich im Rahmen der Linear-Response-Theorie²⁰⁹ durch

$$S(\mathbf{q}, \omega) \sim \frac{\chi''(\omega)}{1 - \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right)} \quad (3.10)$$

bzw. für den Fall $\hbar\omega \ll k_B T$ durch

$$J_l(\omega) \sim \frac{\chi''(\omega)}{\omega} \quad (3.11)$$

mit dem Verlustanteil einer komplexen Suszeptibilität $\chi(\omega)$ in Verbindung bringen.

Im einfachsten Fall eines Debye-Prozesses mit einer einzigen charakteristischen Korrelationszeit τ kann die Korrelationsfunktion durch einen exponentiellen Abfall

Verteilungen von
Korrelations-
zeiten

$$C_D(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3.12)$$

beschrieben werden. Ein exponentieller Abfall entspricht der Debye-Suszeptibilität

$$\chi_D(\omega) = \frac{1}{1 + i\omega\tau}, \quad (3.13)$$

deren Verlustanteil eine Steigung von ω^1 auf der Niederfrequenzflanke und eine Steigung von ω^{-1} auf der Hochfrequenzflanke aufweist (schwarze Linien in Bild 3.3). Formal können Suszeptibilitäten bzw. Korrelationsfunktionen als mit einer Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ gewichtete Summation einzelner Debye-Prozesse aufgefasst werden:

$$C(t) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\ln \tau) e^{-\frac{t}{\tau}} d\ln \tau, \quad (3.14)$$

$$\chi(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\ln \tau) \frac{1}{1 + i\omega\tau} d\ln \tau. \quad (3.15)$$

Bild 3.3 zeigt eine Übersicht über die Kurvenverläufe der im Folgenden genannten Verteilungen. In der Zeitdomäne findet man häufig einen gestreckt-exponentiellen Abfall der Korrelationsfunktion

$$C(t) = \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau} \right)^\beta \right]. \quad (3.16)$$

Der Streckungsparameter β der Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion^{80,81} ist ein Maß für die Breite der unterliegenden Verteilung. Er bewegt sich zwischen den Grenzen Null und Eins und nimmt mit zunehmender Breite der Verteilung ab.

In der Frequenzdomäne können unterschiedliche Modelle angewendet werden, um die Frequenzabhängigkeit zu beschreiben. Eine empirische Funktion, mit der die Suszeptibilität beschrieben werden kann, ist die Havriliak-Negami(HN)-Funktion²¹⁰

$$\chi_{\text{HN}}(\omega) = \frac{1}{[1 + (i\omega\tau_{\text{HN}})^\alpha]^\gamma} \quad (3.17)$$

mit $0 < \alpha \leq 1$ und $0 < \alpha\gamma \leq 1$. Der Verlustanteil hat eine Frequenzabhängigkeit von ω^α auf der Niederfrequenzflanke und $\omega^{-\alpha\gamma}$ auf der Hochfrequenzflanke. Durch die fehlende Abhängigkeit der beiden Flanken voneinander ist somit eine flexible Anpassung experimenteller Messdaten möglich. Die Havriliak-Negami-Funktion ist für den Grenzfall $\alpha = \gamma = 1$ identisch mit der Debye-Funktion.

Zwei Verteilungen, die aus der Havriliak-Negami-Funktionen hervorgehen und die häufig zur Beschreibung von Suszeptibilitäten herangezogen werden, sind die Cole-Cole(CC)-Funktion²¹¹

$$\chi_{\text{CC}}(\omega) = \frac{1}{(1 + i\omega\tau_{\text{CC}})^\gamma} \quad (3.18a)$$

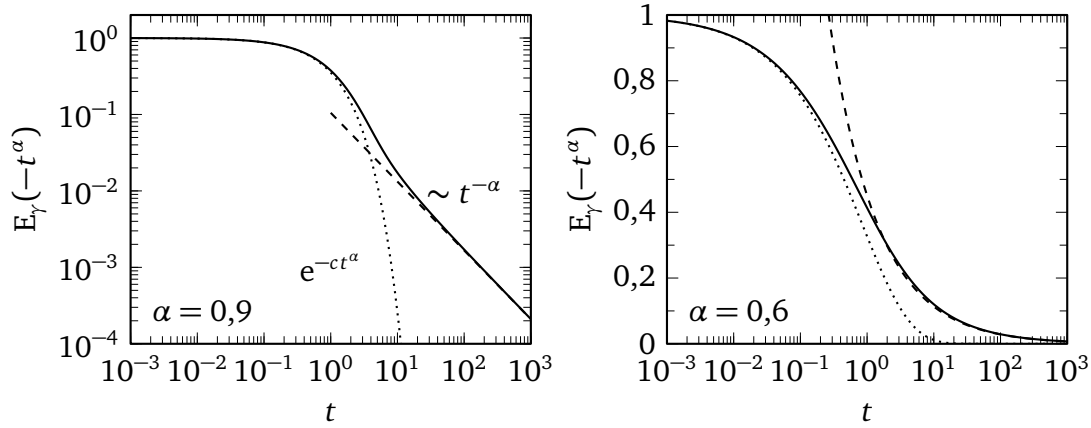


Bild 3.1: Mittag-Leffler-Funktion für Parameter $\alpha = 0,9$ und $\alpha = 0,6$ mit Näherungen für $t \rightarrow 0$ (gestrichelt) und $t \rightarrow \infty$ (gepunktet).

im Fall $\alpha = 1$ und die Cole-Davidson(CD)-Funktion²¹²

$$\chi_{\text{CD}}(\omega) = \frac{1}{[1 + (i\omega\tau_{\text{CD}})^\alpha]} \quad (3.18b)$$

im Fall $\gamma = 1$. Wie in Bild 3.3 dargestellt ist, ist sowohl die Verteilung an Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ als auch der Verlustanteil der Suszeptibilität χ'' der Cole-Cole-Funktion symmetrisch um die charakteristische Zeit τ_{CC} . Die Korrelationsfunktion in der Zeitdomäne lässt sich für diese Verteilung als²¹³

$$C(t) = E_\gamma \left[- \left(\frac{t}{\tau_{\text{CC}}} \right)^\gamma \right] \quad (3.19)$$

mit der Mittag-Leffler(ML)-Funktion²¹⁴

$$E_\gamma(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{z^k}{\Gamma(\gamma k + 1)} \quad (3.20)$$

beschreiben (Bild 3.1), wobei Γ die Gamma-Funktion $\Gamma(x) = \int_0^\infty u^{x-1} e^{-u} du$ bezeichnet. Für kurze Zeiten entspricht sie einer gestreckt exponentieller Funktion, fällt für lange Zeit aber langsamer als diese ab und folgt einem Potenzgesetz $t^{-\gamma}$. Die Cole-Cole-Funktion wird in dielektrischer und NMR-Spektroskopie meist zur Parametrisierung der Dynamik von Protein-Lösungsmittel-Mischungen verwendet.^{127,146,154,155,215} Die Mittag-Leffler- bzw. Cole-Cole-Funktion erhält man aber nicht nur bei Existenz der entsprechenden Korrelationszeitenverteilung, sondern auch bei Annahme Brownscher Diffusion in fraktalen Strukturen.^{216,217} Diese Modellie-

rung wurde auf Proteinsysteme angewandt, um dort beobachtete Subdiffusion zu beschreiben.^{121,218,219}

Die Verteilung der Cole-Davidson-Funktion besitzt im Gegensatz zur Cole-Cole-Funktion eine obere Grenze bei τ_{CD} , was zur gezeigten Asymmetrie des Verlustes bezüglich des Maximums führt. Sie wird häufig zur Beschreibung der strukturellen Relaxation einfacher Glasbildner benutzt.^{50,53,220} Aufgrund ähnlicher Kurvenverläufe ist es möglich, die Parameter der Kohlrausch-Williams-Watts- und der Cole-Davidson-Funktion ineinander zu überführen.²²¹

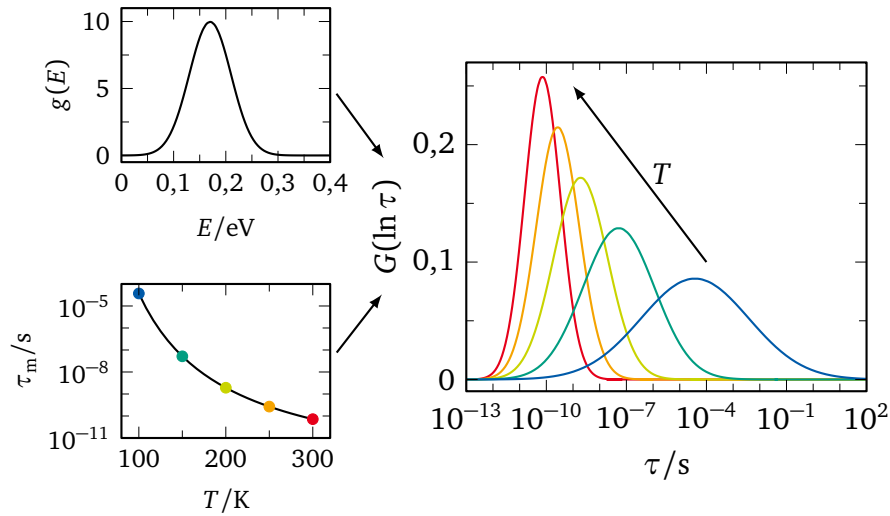


Bild 3.2: Temperaturentwicklung der logarithmischen Gaußverteilung $G(\ln \tau)$ bei gegebener Energieverteilung $g(E)$ und temperaturabhängigen Korrelationszeit $\tau_m(T)$.

Eine weitere Möglichkeit, eine Verteilung von Korrelationszeiten zu beschreiben, ist durch eine Gaußverteilung von Aktivierungsenergien bzw. Energiebarrieren

$$g(E) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_E} \exp\left(-\frac{(E - E_m)^2}{2\sigma_E^2}\right) \quad (3.21)$$

mit mittlerer Energie E_m und Standardabweichung σ_E . In diesem Fall folgt unter der Annahme, dass die Korrelationszeit τ durch die Arrhenius-Funktion

$$\tau(E, T) = \tau_0 \exp\left(\frac{E}{k_B T}\right) \quad (3.22)$$

mit der Aktivierungsenergie E verknüpft ist, aus der Gaußverteilung von Energien

eine logarithmischen Gaußverteilung von Korrelationszeiten (Log-Gauß, LG)

$$G(\ln \tau) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_\tau} \exp \left\{ -\frac{[\ln \tau - \ln \tau_m]^2}{2\sigma_\tau^2} \right\} \quad (3.23)$$

mit der temperaturabhängigen Breite $\sigma_\tau = \sigma_E/(k_B T)$ und mittlerer Korrelationszeit $\tau_m = \tau(E_m, T)$ (Bild 3.2).

Zur Beschreibung von Dynamik wird eine charakteristische Zeit τ_c betrachtet. Existiert eine Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$, kann die charakteristische Zeit von der Form der Verteilung beeinflusst werden. Als charakteristische Zeit wird meist einer der folgenden Werte genutzt:

Charakteristische Zeiten

- Arithmetisches Mittel $\tau_a \equiv \langle \tau \rangle_a = \int_{-\infty}^{\infty} G(\ln \tau) \tau \, d \ln \tau$,
- geometrisches Mittel $\tau_g \equiv \langle \tau \rangle_g = \exp(\langle \ln \tau \rangle_a)$,
- Maximumsposition τ_p der zur Verteilung gehörenden Suszeptibilität $\chi''(\omega)$.

Bei Verteilungen $G(\ln \tau)$, die auf logarithmischer Zeitskala symmetrisch sind (z. B. Cole-Cole- und Log-Gauß-Funktion), fallen geometrisches Mittel und Maximumsposition mit der in der Funktion stehenden Zeit τ

$$\tau_p = \tau_g = \tau \quad (3.24)$$

zusammen. Das arithmetische Mittel wiederum hängt für die Log-Gauß-Funktion vom Breitenparameter σ ab und kann für die Cole-Cole-Funktion nicht bestimmt werden. Für Zeiten, die in der Frequenzdomäne aus Havriliak-Negami- oder Cole-Davidson-Funktion oder in der Zeitdomäne aus der Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion gewonnen werden und eine asymmetrische Korrelationszeitenverteilung aufweisen, unterscheiden sich die charakteristischen Zeiten hingegen deutlich. Das arithmetische Mittel τ_a lässt sich bei Kenntnis von τ und den entsprechenden Streckungsparametern für die genannten Funktionen über

$$\tau_a = \begin{cases} \tau \exp\left(\frac{\sigma^2}{2}\right) & \text{Log-Gauß,}^{222} \\ \gamma \tau & \text{Cole-Davidson}^{221}, \\ \alpha \gamma \tau & \text{Havriliak-Negami,}^{223} \\ \frac{\tau}{\beta} \Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right) & \text{Kohlrausch-Williams-Watts}^{221} \end{cases} \quad (3.25)$$

berechnen. Das geometrische Mittel τ_g lässt sich aus dem logarithmischen arithmetischen Mittel $\langle \ln \tau \rangle_a$ berechnen, die von Zorn²²⁴ als

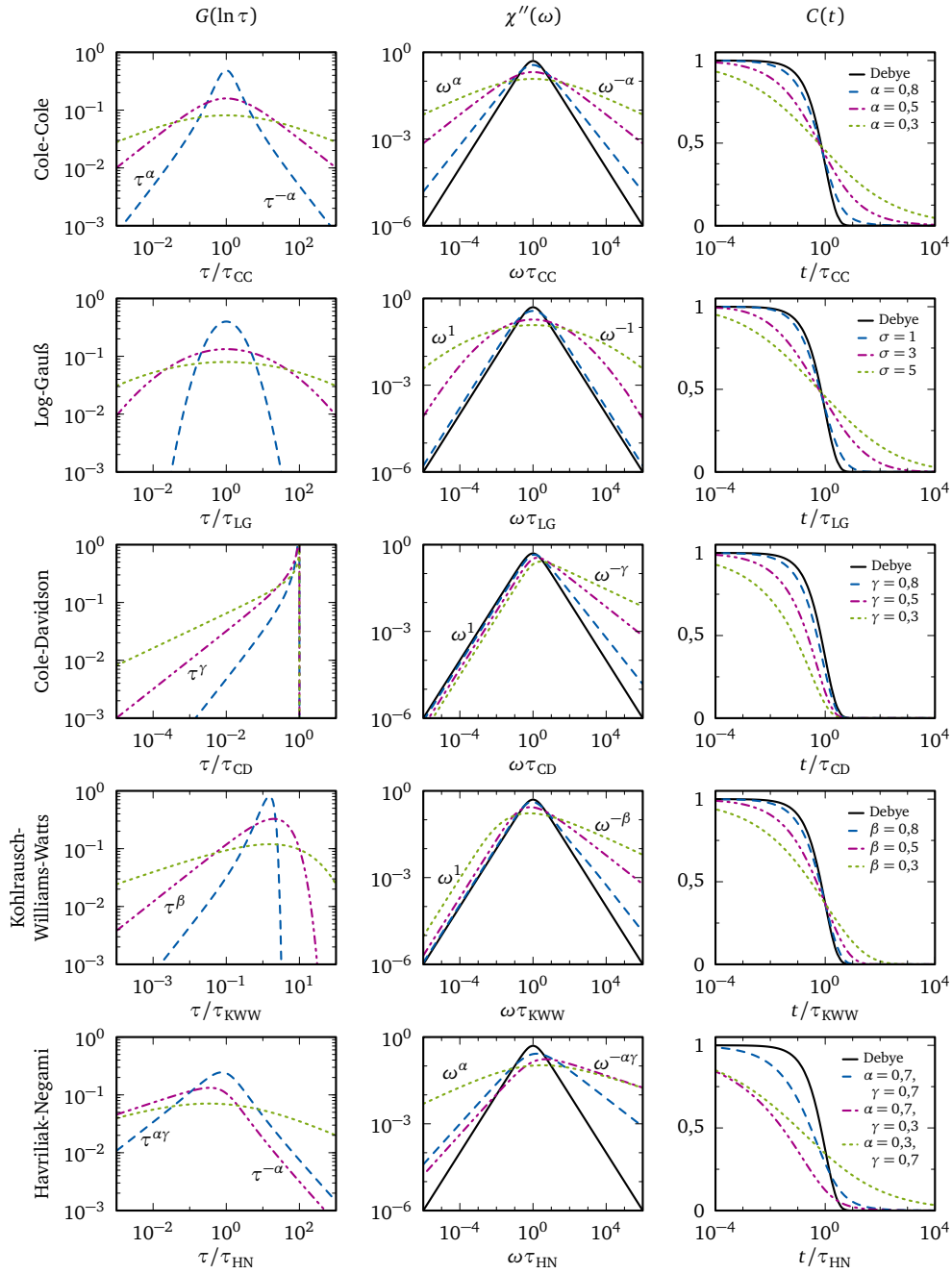


Bild 3.3: Verteilung der Korrelationsfunktion $G(\ln \tau)$ (linke Spalte), Verlustanteil der Suszeptibilität $\chi''(\omega)$ (mittlere Spalte) und Korrelationsabfall $C(t)$ (rechte Spalte) für Cole-Cole, Log-Gauß, Cole-Davidson, Kohlrausch-Williams-Watt und Havriliak-Negami für unterschiedliche Verteilungsbreiten. Als Referenz ist der Fall des Debye-Prozesses χ_D'' als durchgezogene Linie eingezeichnet. Die Gleichungen zur Berechnung finden sich in Abschnitt B..

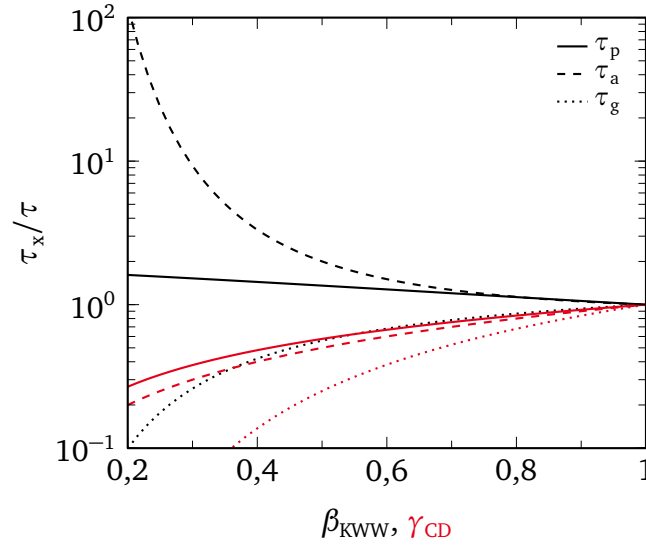


Bild 3.4: Charakteristische Zeiten der Cole-Davidson- (rot) und der Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion (schwarz) in Abhängigkeit vom Streckungsparameter.

$$\langle \ln \tau \rangle_a = \begin{cases} \ln \tau + \psi(\gamma) + Eu & \text{Cole-Davidson,} \\ \ln \tau + \frac{\psi(\gamma) + Eu}{\alpha} & \text{Havriliak-Negami} \\ (1 - \frac{1}{\beta})Eu + \ln \tau & \text{Kohlrausch-Williams-Watts} \end{cases} \quad (3.26)$$

mit der Euler-Mascheroni-Konstanten $Eu \approx 0,5772$ und der Digamma-Funktion $\psi(x) = d \ln \Gamma(x) / dx$ angegeben werden. Die Maximumsposition τ_p lässt sich bei Methoden wie der dielektrischen Spektroskopie, die direkt eine Suszeptibilität messen, direkt aus den Messdaten ablesen. Für die drei genannten Funktionen kann dieser Wert aber auch über

$$\tau_p = \begin{cases} \tau \left[\tan \left(\frac{\pi}{2(\gamma+1)} \right) \right]^{-1} & \text{CD,}^{225} \\ \tau \left[\sin \left(\frac{\pi \alpha \gamma}{2(\gamma+1)} \right) \right]^{1/\alpha} \left[\sin \left(\frac{\pi \alpha}{2(\gamma+1)} \right) \right]^{-1/\alpha} & \text{HN,}^{225} \\ \tau (1,7851 - 0,87052\beta - 0,028836\beta^2 + 0,11391\beta^3) & \text{KWW} \end{cases} \quad (3.27)$$

berechnet werden. Die Gleichung zur Berechnung von τ_p im Fall der Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion stellt eine Näherung dar. Sie ist das Ergebnis der Anpassung eines Polynoms dritter Ordnung an die Maximapositionen, nachdem der Verlustanteil der Suszeptibilität durch numerische Fouriertransformation berechnet worden ist.

Bild 3.4 zeigt den Einfluss des Streckungsparameter auf die charakteristischen Zeiten für die Cole-Davidson- und die Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion. In allen Fällen

sind zunehmend Abweichungen vom Parameter τ mit zunehmender Verteilungsbreite β bzw. γ zu beobachten. Das arithmetische Mittel τ_a berücksichtigt im Vergleich zum geometrischen Mittel stärker lange Korrelationszeiten und ist daher immer der größere der beiden Werte. Von den drei Zeiten ist die Maximumsposition τ_p die Größe, die am wenigsten von der Verteilungsbreite beeinflusst wird, wie besonders deutlich für die Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion zu sehen ist. Aus diesem Grund und auch um eine einfachere Vergleichbarkeit mit Literaturdaten aus dielektrischer Spektroskopie, die häufig die Maximumsposition angeben, zu erreichen, wird in dieser Arbeit als charakteristische Größe zur Beschreibung von Korrelationszeiten die Maximumsposition τ_p genutzt. Der Begriff Korrelationszeit und das Symbol τ stehen daher im Folgenden immer für die Maximumsposition τ_p .

3.2 Magnetische Kernspinresonanz (NMR)

Die Kernspinresonanz ist die meistgenutzte experimentelle Methode dieser Arbeit, mit deren Hilfe sowohl Proteindynamik als auch Lösungsmitteldynamik untersucht wurde. Die folgenden Grundlagen basieren in weiten Teilen auf den Büchern von Schmidt-Rohr und Spiess,²⁰⁶ Slichter²²⁶ und Duer.²²⁷

Zeeman-
Wechselwirkung

Wird ein Isotop, dessen Kernspin I ungleich Null ist, in ein Magnetfeld $\mathbf{B}_0 = B_0 \mathbf{e}_z$ gebracht, treten Spin $\hat{\mathbf{I}}$ und Magnetfeld über die Zeeman-Wechselwirkung

$$\hat{\mathcal{H}}_Z = -\gamma \mathbf{B}_0 \hat{\mathbf{I}} = -\gamma B_0 \hat{I}_z \quad (3.28)$$

miteinander in Wechselwirkung. Das gyromagnetische Verhältnis γ ist eine isotopenspezifische Größe, die es NMR-Experimenten ermöglicht, isotopenselektiv Dynamik zu untersuchen. Die Zeeman-Wechselwirkung hat eine Aufhebung der Entartung der $2I + 1$ magnetischen Energieniveaus zur Folge, wobei benachbarte Energieniveaus durch den Energieunterschied

$$\Delta E_{i,i+1} = \omega_L = -\gamma B_0 \quad (3.29)$$

getrennt sind.* Die Energieaufspaltung ω_L entspricht der Präzessionsfrequenz oder Larmorfrequenz ω_L im magnetischen Feld bei klassischer Betrachtung der Spins als magnetische Dipole.

Durch die große Anzahl an Spins bietet sich eine Betrachtung des Ensembles im Dichtematrixformalismus an. Das Spinsystem lässt sich mithilfe des Dichteopera-

* Diese Arbeit folgt der Konvention der NMR und drückt Energien in Einheiten von \hbar aus. Der Faktor \hbar entfällt daher hier und auch in der weiteren Arbeit.

tors

$$\hat{\rho}(t) = \sum_{i,j} c_i^*(t) c_j(t) |i\rangle \langle j| \quad (3.30)$$

ausdrücken, wobei $|i\rangle$ die Eigenzustände des Hamiltonoperators $\hat{\mathcal{H}}$ in einer geeigneten Basis[†] mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit c_i der entsprechenden Zustände sind. Der Erwartungswert eines Operators \hat{X} kann durch Spurbildung mit

$$\langle \hat{X} \rangle = \text{Spur}(\hat{X} \hat{\rho}) \quad (3.31)$$

berechnet werden. Die zeitliche Entwicklung des Dichteoperator wird durch die Von-Neumann-Gleichung

$$\frac{d\hat{\rho}}{dt} = -i[\hat{\mathcal{H}}, \hat{\rho}] \quad (3.32)$$

bestimmt. Bei gegebenem Anfangszustand $\hat{\rho}_0$ ist die Lösung dieser Differentialgleichung

$$\hat{\rho}(t) = \hat{U}(t) \hat{\rho}_0 \hat{U}^{-1}(t) \quad (3.33)$$

mit dem Propagator $\hat{U}(t)$, der für zeitunabhängige Hamiltonoperatoren $\hat{\mathcal{H}}$ durch

$$\hat{U}(t) = \exp(i\hat{\mathcal{H}}t) \quad (3.34)$$

gegeben ist. Für ein Spinsystem im thermischen Gleichgewicht bestimmt eine Boltzmann-Verteilung

$$\hat{\rho}_0 = \frac{\exp(-\hat{\mathcal{H}}/k_B T)}{\text{Spur}[\exp(-\hat{\mathcal{H}}/k_B T)]} \quad (3.35)$$

den Anfangszustand $\hat{\rho}_0$ in Gleichung (3.33). In der NMR-Spektroskopie, in der bei Temperaturen oberhalb von einem Kelvin für die führende Zeeman-Wechselwirkung $\hat{\mathcal{H}} \ll k_B T$ gilt, ist der Anfangszustand nach Taylor-Entwicklung im thermischen Gleichgewicht

$$\hat{\rho}_0 \propto \mathbb{1} + \frac{\omega_L}{k_B T} \hat{I}_z \quad (3.36)$$

proportional zum Spinzustand \hat{I}_z . Somit folgt die detektierte Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 dem Curie-Gesetz

$$M_0(T) \sim T^{-1}. \quad (3.37)$$

Neben der Zeeman-Wechselwirkung treten zusätzliche lokale Wechselwirkungen auf, die Informationen über lokale Struktur und Dynamik enthalten. Zur Detektion von Dynamik ist es möglich den Zustand des Spinsystems mithilfe von RF-Pulsen zu

Lokale Wechselwirkungen

[†] In der NMR werden als Basis häufig die irreduziblen sphärischen Tensoroperatoren gewählt.

manipulieren. Der wirkende Gesamthamiltonoperator ist

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{ges}} = \hat{\mathcal{H}}_{\text{Z}} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{lok}} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{RF}}, \quad (3.38)$$

auf dessen Beiträge im Folgenden genauer eingegangen wird. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen sind häufig mehrere Größenordnungen kleiner im Vergleich zur Zeeman-Wechselwirkung. Dadurch ist es ausreichend im Hamiltonoperator, der für die Zeitentwicklung relevant ist, neben der Zeeman-Wechselwirkung nur Anteile der Wechselwirkung zu berücksichtigen, die mit diesem kommutieren (säkulare Näherung).

Tabelle 3.1: Übersicht über interne Wechselwirkungen bei Beschreibung nach Gleichung (3.39).²²⁸

Term	Chemische Verschiebung	Dipol-Dipol	Quadrupol
K	Gyromagnetisches Verhältnis γ_I	$\frac{4\pi}{\mu_0} \hbar \gamma_I \gamma_S$	$\frac{eQ}{\hbar 2I(2I-1)}$
C	Abschirmung σ	dipolare Kopplung D	elektrischer Feldgradient V
J	Magnetfeld B_0	Spin \hat{S}	Spin \hat{I}

Allgemeine
Betrachtung von
Wechsel-
wirkungen

Der Hamiltonoperator lokaler Wechselwirkungen eines Spins \hat{I} lässt sich in der Form²²⁹

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{lok}} = K \cdot \hat{I} \cdot C \cdot J \quad (3.39)$$

mit dem Vorfaktor K und dem Kopplungstensor C darstellen, der die Wechselwirkung zwischen \hat{I} und einem Vektor J beschreibt. Die genaue Form und Bedeutung dieser Parameter sind abhängig von der betrachteten Wechselwirkung. Sie sind in Tabelle 3.1 für die in dieser Arbeit relevanten Wechselwirkungen aufgelistet. Eine besonders einfache Form hat der Kopplungstensor in dessen Hauptachsensystem, in dem eine Diagonalform mit Einträgen $C_{yy} \leq C_{xx} \leq C_{zz}$ vorliegt. Für den Fall, dass der Tensor C nicht spurlos ist, kann der Kopplungstensor in einen isotropen Anteil

$$C_{\text{iso}} = \frac{1}{3} \text{Spur}(C) \quad (3.40a)$$

und einen anisotropen Anteil

$$C_{\text{aniso}} = C - C_{\text{iso}} \quad (3.40b)$$

aufgespalten werden. Der Hamiltonoperator des isotropen Anteils ist unabhängig

von der Wahl des Koordinatensystems

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{iso}} = K \cdot C_{\text{iso}}. \quad (3.41)$$

Der säkulare Anteil des anisotropen Hamiltonoperators ist nach einer Koordinatentransformation in das Laborsystem

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{aniso}} = \delta \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi). \quad (3.42)$$

Die Winkel θ und ϕ ergeben sich aus der Orientierung des äußeren Magnetfelds \mathbf{B}_0 bezüglich des Hauptachsensystems (Bild 3.5). Als neue Parameter dienen im

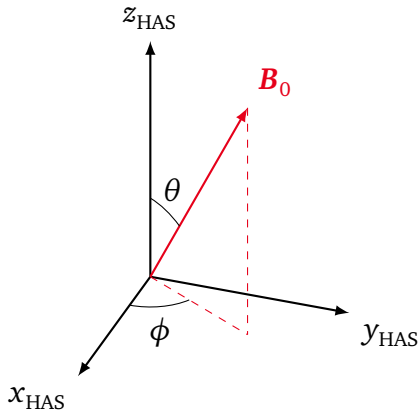


Bild 3.5: Beziehung zwischen Hauptachsensystem eines Kopplungstensors und dem äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 .

orientierungsabhängigen Anteil $\hat{\mathcal{H}}_{\text{aniso}}$ die Anisotropie

$$\delta := K \cdot (C_{zz} - C_{\text{iso}}) \quad (3.43a)$$

und die Asymmetrie

$$\eta := \frac{C_{xx} - C_{yy}}{C_{zz} - C_{\text{iso}}}, \quad (3.43b)$$

die als Maß für die Abweichung des Tensors von einer Kugelsymmetrie bzw. einer Zylindersymmetrie dienen.

Liegt in der Umgebung des Kerns eine asymmetrische Ladungsverteilung vor, werden für Isotope mit Spin $I \geq 1$ und Quadrupolmoment Q die Energieniveaus des Zeeman-Hamilton mit

$$\hat{\mathcal{H}}_Q = \frac{eQ}{2I(2I-1)\hbar} \hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{V} \cdot \hat{\mathbf{I}} \quad (3.44)$$

Quadrupolare
Wechselwirkung

verschoben. Die Komponenten des elektrischen Feldgradienten \mathbf{V} hängen dabei vom elektrischen Potential Φ am Kernort über

$$V_{\alpha\beta} = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial r_\alpha \partial r_\beta} \quad (3.45)$$

ab. Im Laborsystem ist Gleichung (3.44) durch

$$\omega_Q = \pm \delta \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1 - \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi) \quad (3.46)$$

mit dem Anisotropieparameter

$$\delta = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{\hbar} \quad (3.47)$$

festgelegt. Die Winkel θ und ϕ sind festgelegt durch die Orientierung des äußeren Magnetfelds bezüglich der Hauptachsen des elektrischen Feldgradiententensors. Im Fall von Deuterium liegt die Hauptachse mit dem größten Hauptwert V_{zz} parallel zur Bindungsachse, weshalb eine Reorientierung der Bindung aufgrund der entsprechenden Frequenzänderung detektierbar ist.

Dipolare Kopplung Befinden sich zwei Kerne mit Kernspin $\hat{\mathbf{I}}$ und $\hat{\mathbf{S}}$ im Abstand \mathbf{r}_{IS} zueinander, lässt sich die Wechselwirkung der zugehörigen magnetischen Dipolmomente als

$$\hat{\mathcal{H}}_{DD} = -\frac{\mu_0}{4\pi} \cdot \hbar \gamma_I \gamma_S \left[\frac{\hat{\mathbf{I}} \cdot \hat{\mathbf{S}}}{r_{IS}^3} - 3 \frac{(\hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{r}_{IS})(\hat{\mathbf{S}} \cdot \mathbf{r}_{IS})}{r_{IS}^5} \right] \quad (3.48)$$

oder nach Gleichung (3.39) als

$$\hat{\mathcal{H}}_{DD} = -2\omega_{IS} \hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{D} \cdot \hat{\mathbf{S}} \quad (3.49)$$

schreiben. Bei der Betrachtung der säkularen Beiträge muss nun zwischen der Wechselwirkung unterschiedlicher Isotope, dem heteronuklearen Fall, und der Wechselwirkung gleicher Isotope, dem homonuklearen Fall, unterschieden werden. Die Hamiltonoperatoren lassen sich im Laborsystem durch

$$\omega_{DD}^{\text{homo}} = -\omega_{IS} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1) (3 \hat{I}_z \hat{S}_z - \hat{\mathbf{I}} \cdot \hat{\mathbf{S}}) \quad (3.50a)$$

und

$$\omega_{DD}^{\text{hetero}} = -\omega_{IS} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1) 2 \hat{I}_z \hat{S}_z \quad (3.50b)$$

beschreiben, wobei die Richtung des Vektors \mathbf{r} und das äußere Magnetfeld \mathbf{B}_0 den

Winkel θ_{IS} festlegen. Die dipolare Kopplungsstärke ω_{IS} ist definiert als

$$\omega_{IS} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{r_{IS}^3}. \quad (3.51)$$

Im Allgemeinen besteht eine dipolare Kopplung eines Spins jedoch nicht nur zu einem Spin \hat{S} sondern zu allen vorhandenen Spins. Auf einen Spin \hat{I} wirkt daher die Summe aller einzelnen dipolaren Kopplungsoperatoren

$$\hat{\mathcal{H}}_I = \sum_{\hat{S}} \hat{\mathcal{H}}_{\text{DD},\hat{S}} \quad (3.52)$$

Das effektive Magnetfeld \mathbf{B}_{eff} , das auf einen Kernspin \hat{I} wirkt, unterscheidet sich in der Regel vom äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 , da die Elektronenhülle das äußere Magnetfeld abschirmt und sich ein lokales Feld $\mathbf{B}_{\text{lok}} = \boldsymbol{\sigma} \mathbf{B}_0$ ausbildet. Die Änderung der Frequenz kann durch den Hamiltonoperator

Chemische
Verschiebung

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{CS}} = \gamma \hat{I} \boldsymbol{\sigma} \mathbf{B}_0 = -\hat{I} \boldsymbol{\sigma} \boldsymbol{\omega}_0 \quad (3.53)$$

beschrieben werden. Anders als die dipolare Kopplung oder die quadrupolare Wechselwirkung ist der Wechselwirkungstensor $\boldsymbol{\sigma}$ nicht spurlos, sodass die chemische Verschiebung im Laborsystem durch

$$\omega_{\text{CS}} = -\omega_0 \sigma_{\text{iso}} - \frac{\delta}{2} [3 \cos^2 \theta - 1 - \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi] \quad (3.54)$$

mit den in Abschnitt 3.2 eingeführten Parametern beschrieben wird. Da die chemische Verschiebung mit der Feldstärke des Magnetfelds $|\mathbf{B}_0|$ skaliert, wird sie meist nicht absolut in Hz bzw. s^{-1} , sondern als Verschiebung

$$\delta_i = \frac{f_i - f_{\text{ref}}}{f_{\text{ref}}} \quad (3.55)$$

bezüglich einer standardisierten Referenz angegeben.²³⁰ Diese Angabe hat gegenüber der Angabe der absoluten Verschiebung den Vorteil einer feldunabhängigen Beschreibung der chemischen Verschiebung. Da die relative Verschiebung im Bereich einiger Hertz liegt, während die Referenzfrequenz etwa sechs Größenordnungen größer ist, wird die chemische Verschiebung meist in parts per million (ppm) angegeben. Für die Referenzierung wird sowohl in der ^{13}C -NMR als auch der ^1H -NMR die Substanz Tetramethylsilan verwendet.

Die Stärke sowohl der isotropen als auch der anisotropen chemischen Verschiebung hängt von der chemischen Struktur ab, wie in Bild 3.6 zu sehen ist: In der ^{13}C -NMR

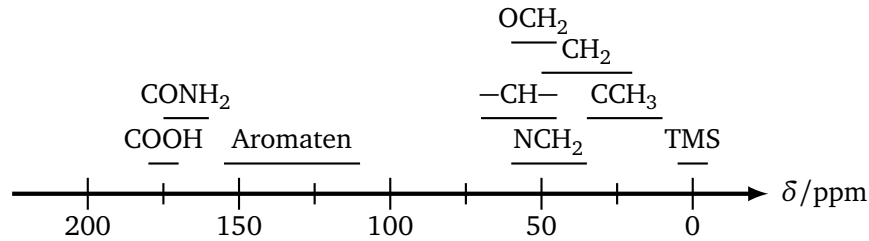


Bild 3.6: Isotrope chemische Verschiebungen organischer Struktureinheiten im ^{13}C -Spektrum (nach Levitt²³¹).

weisen aliphatische Verbindungen nur geringe Verschiebungen zwischen 0 ppm und 50 ppm auf, aromatische Verbindungen liegen im Bereich von etwa 120 ppm. Tritt in der Nähe eines Kohlenstoffatoms ein Sauerstoff auf, führt dies zu einer Erhöhung der Verschiebung, z. B. für Carboxylgruppen bei etwa 175 ppm. Wird die Anisotropie der chemischen Verschiebung z. B. durch Magic Angle Spinning (s. Seite 45) unterdrückt, kann die Strukturabhängigkeit der isotropen chemischen Verschiebung dazu genutzt werden, einzelnen Resonanzlinien chemische Struktureinheiten zuzuordnen und Dynamik dieser Einheiten getrennt voneinander zu untersuchen.

3.3 Untersuchung der Dynamik mit ^2H -NMR

Durch Kombination verschiedener NMR-Experimente ist es möglich, Korrelationszeiten über einen Zeitbereich zwischen etwa 10^{-11} s und 10 s zu bestimmen. Die passende Präparation der Spinzustände geschieht dafür durch Einstrahlung kurzer Radiofrequenz(RF)-Pulse. In Abwesenheit von lokalen Wechselwirkungen ist der Hamiltonoperator während der Einstrahlung

$$\hat{\mathcal{H}} = \omega_L \hat{I}_z - \frac{\gamma B_1}{2} \cos(\omega_{\text{RF}} t) \hat{I}_y = \omega_L \hat{I}_z - \frac{\gamma B_1}{2} e^{-i\omega_{\text{RF}} t} \hat{I}_y e^{i\omega_{\text{RF}} t}, \quad (3.56)$$

wobei hier beispielhaft ein Puls mit Amplitude B_1 , Frequenz ω_{RF} und Dauer t entlang der y -Achse angenommen wurde. Um die Zeitabhängigkeit zu entfernen, bietet sich ein Wechsel in ein mit ω_{RF} rotierendes Koordinatensystem an. In diesem Koordinatensystem ist der Hamiltonoperator durch

$$\hat{\mathcal{H}}' = e^{i\omega_{\text{RF}} t \hat{I}_z} \hat{\mathcal{H}} e^{-i\omega_{\text{RF}} t \hat{I}_z} - \omega_{\text{RF}} \hat{I}_z \quad (3.57)$$

gegeben und ermöglicht eine Darstellung von Gleichung (3.56) als

$$\hat{\mathcal{H}}' = (\omega_L - \omega_{\text{RF}}) \hat{I}_z - \frac{\gamma B_1}{2} \hat{I}_y. \quad (3.58)$$

Stimmen Larmorfrequenz ω_L und Einstrahlfrequenz überein, ist der wirkende Hamiltonoperator $\hat{\mathcal{H}}' = -\frac{1}{2}\gamma B_1 \hat{I}_y$, was zu einer Rotation der Magnetisierung um die y -Achse führt. Während der Einstrahldauer t des Pulses kann so die Magnetisierung um den Drehwinkel

$$\Psi = \frac{1}{2}\gamma B_1 t \quad (3.59)$$

rotiert werden. Nach der Koordinatentransformation in das rotierende Koordinatensystem erfolgt die Zeitentwicklung des Dichteoperators nach Gleichung (3.33) nur noch unter dem Einfluss lokaler Wechselwirkungen sowie eingestrahelter RF-Pulse.

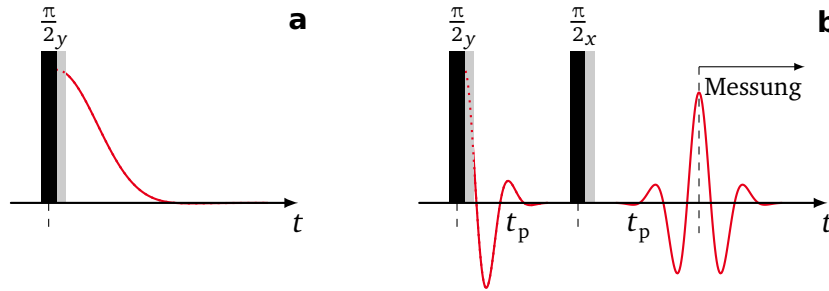


Bild 3.7: Signalaufnahme des freien Induktionszerfalls (a) und im Festkörperecho (b). Graue Bereiche kennzeichnen die für die Detektion unzugängliche Totzeit.

Die Detektion des NMR-Signals geschieht in der Transversalebene des externen Magnetfelds B_0 .²³² Eine Auslenkung in die Transversalebene geschieht wie beschrieben durch RF-Pulse, die in den Darstellungen mit ihrem Drehwinkel Ψ um die Rotationsachse ϕ als Ψ_ϕ gekennzeichnet sind. In dieser Ebene nimmt das Signal durch Dephasierung ab und ein freier Induktionszerfall (engl. free induction decay, FID) wird beobachtet. Experimentell lässt sich eine Totzeit nach Pulsen nicht vermeiden, während der eine Signalaufnahme noch nicht möglich ist. Fällt das Signal während der Totzeit nur schwach ab, ist eine Signalaufnahme des FIDs auch nach der Totzeit möglich (Bild 3.7a). Um den Informationsverlust, der bei starker Dephasierung des Signal während der Totzeit auftritt, zu vermeiden, kann durch Einstrahlung eines zweiten Pulses zum Zeitpunkt t_p eine Rephasierung zur Zeit $2t_p$ jenseits der Totzeit erreicht werden (Bild 3.7b). Im Fall der ^2H -NMR, in der die quadrupolare Wechselwirkung diese Dephasierung verursacht, wird dies als Festkörperecho bezeichnet.

Bei der Signalaufnahme mithilfe eines Echo-Experiments muss jedoch berücksichtigt werden, dass dynamische Prozesse, deren Korrelationszeiten τ im Bereich des Pulsabstandes t_p liegen, mit der Refokussierung des Messsignals interferieren. Da die Signalbeiträge dieser Prozesse im Zeitsignal des Echo-Experimentes fehlen, ist

die detektierte Signalintensität reduziert und die Linienform unterscheidet sich vom entsprechenden FID-Signal.²³³

Relaxations-
messungen

Schnelle Dynamik mit Korrelationszeiten $\tau < 10^{-6}$ s ist über die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 (SGR) zugänglich. In der ^2H -NMR-Relaxometrie ist die makroskopische mittlere Spin-Gitter-Relaxationsrate über die Gleichung²³⁴

$$\left\langle \frac{1}{T_1} \right\rangle = C [J_2(\omega_L) + 4J_2(2\omega_L)] \quad (3.60)$$

mit der spektralen Dichte $J_2(\omega)$ (vgl. Abschnitt 3.1) bei den Frequenzen ω_L und $2\omega_L$ und damit der mikroskopischen Dynamik verknüpft. Der Vorfaktor C ist abhängig von der relaxationswirksamen Wechselwirkung. Im Fall der ^2H -NMR, für die diese Messungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, gilt

$$C = \frac{2}{15} \delta^2 \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right). \quad (3.61)$$

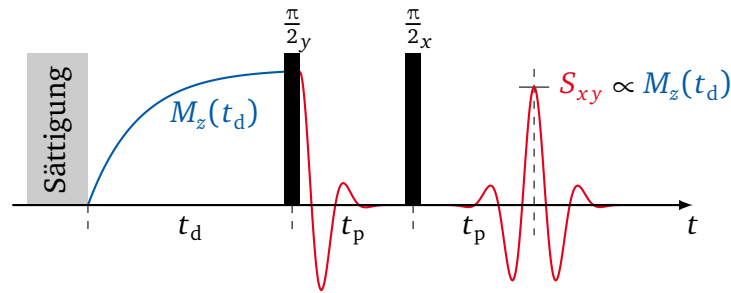


Bild 3.8: Schematische Darstellung der Saturation-Recovery-Pulsfolge. Eine Detektion durch ein Festkörperecho ist nur dann notwendig, wenn ein Großteil des Signalabfalls in der Totzeit vor der Datenaufnahme stattfindet, andernfalls ist Detektion durch ein FID ausreichend.

Experimentell lässt sich die Spin-Gitter-Relaxationszeit beispielsweise mithilfe der Saturation-Recovery-Pulsfolge (Bild 3.8) messen. Nachdem eine Reihe von 90° -Pulsen (sog. Sättigungspulsen) zu Beginn vorhandene Magnetisierung zerstört hat, wird die Rückkehr der Magnetisierung durch Relaxation in den Gleichgewichtszustand M_∞ zu unterschiedlichen Zeiten t_d abgegriffen. Die Detektion geschieht in der ^2H -NMR durch ein Festkörperecho, um Signalverlust in der experimentell bedingten Totzeit nach einem RF-Puls zu vermeiden. Der Magnetisierungsaufbau im Saturation-Recovery-Experiment kann häufig durch die Gleichung

$$M(t_d) = M_0 \left\{ 1 - \exp \left[- \left(\frac{t_d}{T_1} \right)^\beta \right] \right\} \quad (3.62)$$

parametrisiert werden. Existiert eine Verteilung von Relaxationszeiten $V(T_1)$, kann der Streckungsparameter β Werte kleiner als Eins annehmen und es lässt sich die mittlere Spin-Gitter-Relaxationszeit

$$\langle T_1 \rangle = \frac{T_1}{\beta} \Gamma(\beta^{-1}) \quad (3.63)$$

gewinnen. Die Berechnung von Korrelationszeiten mithilfe von Gleichung (3.60) ist nur in einem Bereich möglich, in dem eine Verteilung von Relaxationszeiten auf der experimentellen Zeitskala ausgemittelt ist (d. h. $\beta \approx 1$), da andernfalls die mittlere Zeit $\langle T_1 \rangle$ und das Inverse der mittleren Rate $\langle T_1^{-1} \rangle^{-1}$ nicht mehr äquivalent sind.²³⁵

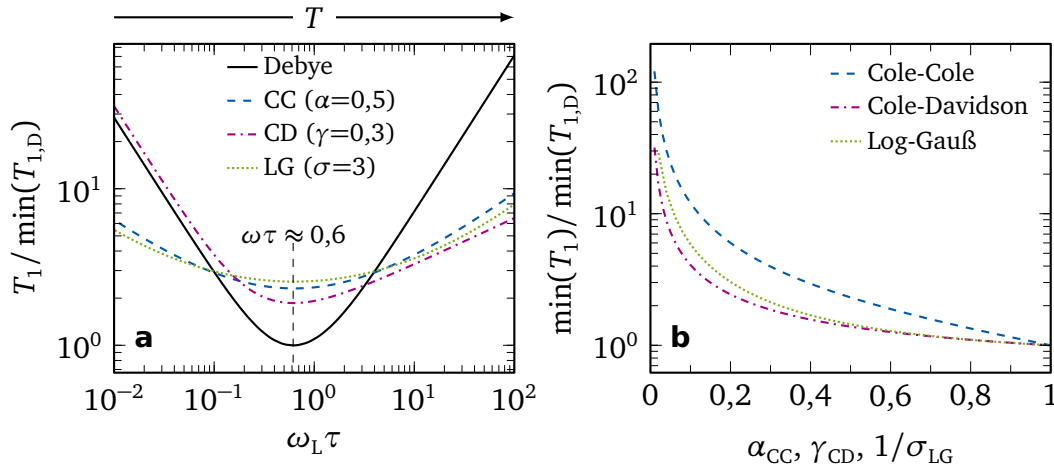


Bild 3.9: (a) Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxation von der Wahl der spektralen Dichte; (b) Abhängigkeit des T_1 -Minimums vom Breitenparameter verschiedener spektralen Dichten.

Wird die Temperatur als Parameter variiert, durchläuft die Spin-Gitter-Relaxationszeit ein Minimum. Aus dem T_1 -Minimum können Informationen über die gegebene spektrale Dichte gezogen werden, da deren Form die Höhe des Minimums beeinflusst. Für einen einfachen Debye-Prozess ist die Minimumshöhe gegeben durch

$$T_{1,\min} = 0,702 \frac{\omega_L}{C}. \quad (3.64)$$

Für eine C— ^2H -Bindung mit Kopplungskonstanten $\delta = 2\pi \cdot 125 \text{ kHz}$ würde man beispielsweise bei einer Larmorfrequenz $\omega_L = 2\pi \cdot 46 \text{ MHz}$ eine Zeit von 2,46 ms für das T_1 -Minimum erwarten. Liegt allerdings eine Verteilung von Korrelationszeiten vor, wird experimentell ein höherer Wert für das T_1 -Minimum als für den Debye-Prozess gefunden, was in Bild 3.9a für verschiedene spektrale Dichten aufgetragen

ist. Für spektrale Dichten $J(\omega)$ wie die Cole-Cole-, Cole-Davidson- sowie Log-Gauß-Funktion, deren Verteilungsbreite nur von einem Parameter beschrieben wird, lässt sich dieser aus der Erhöhung gegenüber dem Minimum eines Debye-Prozesses bestimmen (Bild 3.9b).

Linienform Die Form der durch FID oder Echosequenz aufgenommenen Spektren hängt neben der Art der Wechselwirkung von der Größe der Korrelationszeit im Vergleich zur inversen Kopplungsstärke δ^{-1} ab. Die Kopplungsstärke gibt damit die experimentelle Zeitskala vor, auf der Dynamik zu beobachten ist. Im Fall der ^2H -NMR ist die dominierende Wechselwirkung die Quadrupolwechselwirkung, was bei Kopplungskonstanten der Größenordnung $2\pi \cdot 150 \text{ kHz}$ einer Zeitskala im Mikrosekundenbereich entspricht. Für die Linienform lassen sich zwei Grenzfälle feststellen, die in Bild 3.10 dargestellt sind:

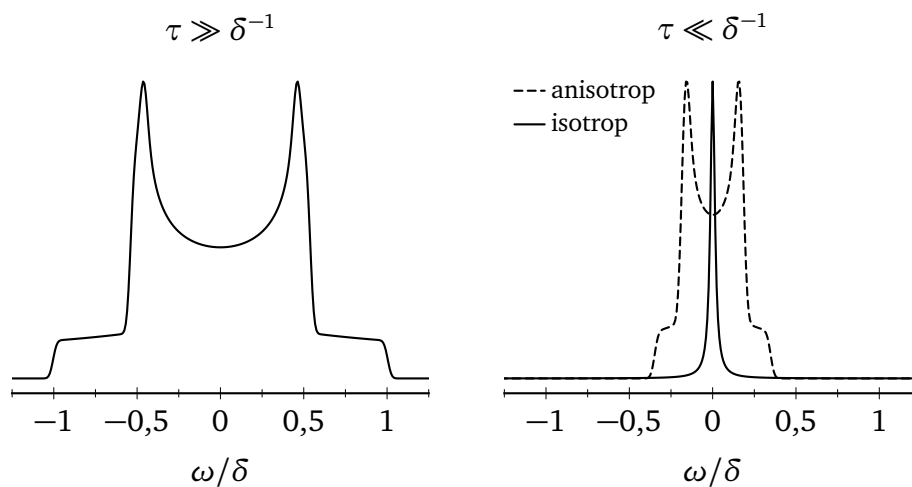


Bild 3.10: Langsamer Grenzfall ($\delta\tau \gg 1$) der ^2H -Linienform bzw. schneller Grenzfall ($\delta\tau \ll 1$) bei isotroper (durchgezogene Linie) und anisotroper (gestrichelte Linie) Reorientierung.

Im Grenzfall langsamer Dynamik $\tau \gg \delta^{-1}$ sind alle möglichen Orientierungen der Winkelpaare (θ, ϕ) auf experimenteller Zeitskala zeitunabhängig. Dies führt bei Spin-1-Teilchen wie ^2H zum sogenannten Pakespektrum, wie es in Bild 3.10 zu sehen ist. Aus diesen statischen Spektren lassen sich die Parameter δ und η der Wechselwirkung ermitteln.

Im Grenzfall schneller Dynamik $\tau \ll \delta^{-1}$ ist die Bewegung auf der experimentellen Zeitskala ausreichend schnell, um mehrere Orientierungen zu durchlaufen und mit einer gemittelten Frequenz zum Spektrum beizutragen. Dabei muss zwischen isotroper und anisotroper Reorientierung unterschieden werden. Mittelung der quadrupolaren Wechselwirkung bei isotroper Bewegung resultiert in einer Lorentzlinie,

da über alle möglichen Winkelpaare (θ, ϕ) gemittelt wird. Bei anisotropen Bewegungen wird hingegen keine komplette Mittelung erreicht. Hier ist die Linienform abhängig von der Symmetrie der Bewegung. Im Fall einer Methylgruppenrotationen, d. h. der Rotation um eine dreizählige Symmetrieachse, wird beispielsweise ein Pakespektrum mit reduzierter Kopplungskonstanten beobachtet.

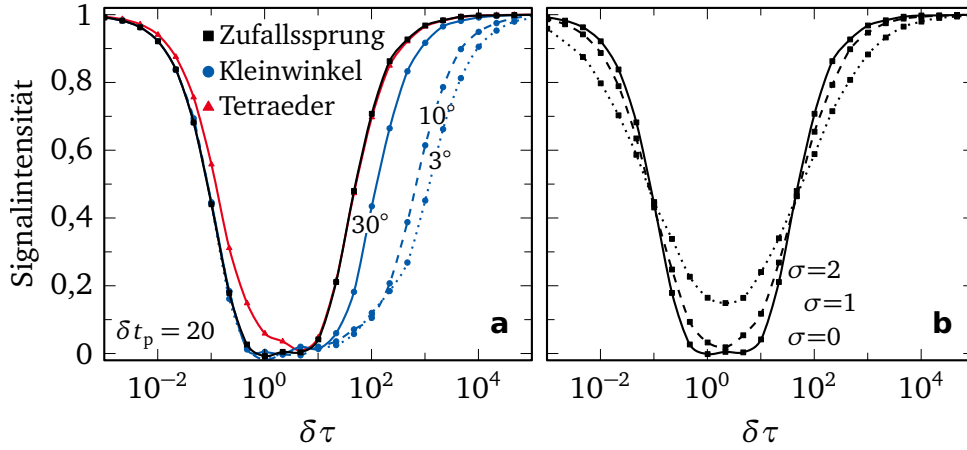


Bild 3.11: Abhängigkeit des Reduktionsfaktor des Festkörperechos von der Korrelationszeit aus Random-Walk-Simulationen: (a) Vergleich von isotropem Zufallssprung, isotroper Reorientierung mit Sprungwinkeln 3° , 10° und 30° und Tetraedersprung, jeweils ohne Verteilung von Korrelationszeiten. (b) Isotroper Zufallssprung bei zusätzlicher Log-Gauß-Verteilung mit Verteilungsbreite σ .

Der Bereich intermediärer Dynamik $\tau \approx \delta^{-1}$ wird von mehreren Größen beeinflusst. So spielt das Bewegungsmodell der Reorientierung, aber auch die Verteilungsbreite der Korrelationszeiten sowie deren Temperaturabhängigkeit eine Rolle. Bei Detektion mithilfe eines Festkörperechos kann zusätzlich auch der Impulsabstand t_p zu einer Änderung der Linienform führen.²³⁶ Auch die reduzierte Signalintensität des Festkörperechos, auch als Reduktionsfaktor bezeichnet, kann in diesem dynamischen Fenster Informationen über Verteilungsbreite und Bewegungsmodell geben. Bild 3.11a zeigt beispielhaft, wie unterschiedliche Bewegungsmodelle die Signalintensität beeinflussen können. Die Signalthöhe im Minimum des Reduktionsfaktors (Bild 3.11b) nimmt mit zunehmender Breite der Korrelationszeitenverteilung zu.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind Zweiphasen- oder Zweikomponentenspektren, die aus der Überlagerung einer Komponente im schnellen Grenzfall und einer Komponente im langsamen Grenzfall bestehen. Solche Spektren können zum einen entstehen, wenn gleichzeitig eine Flüssig- und eine Festkörperkomponenten existieren. Zum anderen können sie beobachtet werden, wenn eine breite Korrelationszeitenverteilung $G(\ln \tau)$ vorhanden ist. In diesem Fall sind Teile der Verteilung schnell bzw. langsam bezüglich der Zeitskala δ^{-1} (Bild 3.12). Normierte

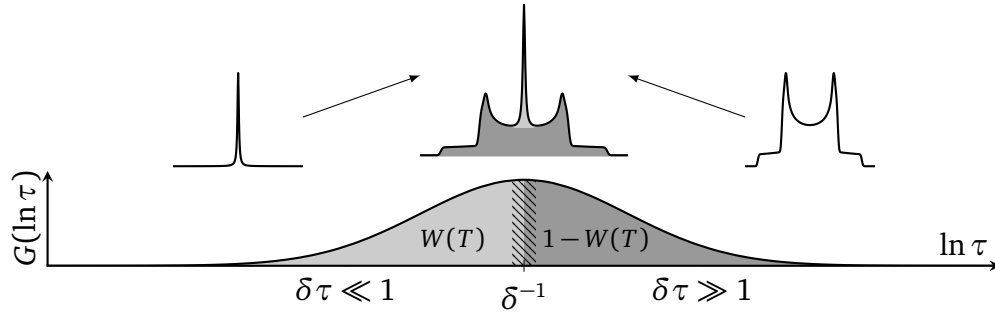


Bild 3.12: Zweikomponentenspektrum als Überlagerung von Spektren im statischen und im schnellen Grenzfall. Schraffiert ist der Bereich der Verteilung, der im Echo-Experiment nicht refokussiert wird und nicht zum Gesamtspektrum beiträgt.

Zweikomponentenspektren $S(\omega, T)$ lassen sich als gewichtete Summe der Komponente $S_s(\omega)$ im schnellen Grenzfall und der Komponente $S_l(\omega)$ im langsamen Grenzfall

$$S(\omega, T) = W(T)S_l(\omega) + [1 - W(T)]S_s(\omega) \quad (3.65)$$

beschreiben,²³⁷ wobei $S_s(\omega)$ und $S_l(\omega)$ ebenfalls normiert sind und im Idealfall eine temperaturunabhängige Linienform aufweisen. Der Gewichtungsfaktor $W(T)$ entspricht dem Anteil der Korrelationszeitenverteilung $G(\ln \tau)$, der die Bedingung $\delta\tau < 1$ erfüllt:

$$W(T) = \int_{-\infty}^{-\ln \delta} G(\ln \tau, T) d\ln \tau. \quad (3.66)$$

Modellunabhängig wird ein Wert von $W(T) = 0,5$ erreicht, wenn die mittlere Korrelationszeit der Verteilung $\tau_m = \delta^{-1}$ erfüllt. Wird die Korrelationszeitenverteilung durch eine Log-Gauß-Verteilung (Gleichung (3.23)) beschrieben, kann der Gewichtungsfaktor mithilfe der Fehlerfunktion $\text{erf}(x) = \int_0^x e^{-x^2} dx$ auch als

$$W(T) = \frac{1}{2} \left[1 - \text{erf} \left\{ \frac{\ln[\delta\tau_m(T)]}{\sqrt{2}\sigma(T)} \right\} \right] \quad (3.67)$$

geschrieben werden. Bei der Beschreibung des Gewichtungsfaktors durch Gleichung (3.66) wird davon ausgegangen, dass aufgrund mangelnder Refokussierung im Festkörperecho Signalbeiträge vernachlässigt werden können, wenn deren Dynamik auf der Zeitskala $\tau \approx \delta^{-1}$ stattfindet (schraffierter Bereich in Bild 3.12).^{94,237,238} Der Einfluss dieser Beiträge kann beispielsweise durch Hinzunahme des Reduktionsfaktors in der Integration berücksichtigt werden.^{239,240}

Besonderen Nutzen besitzt der Gewichtungsfaktor bei Prozessen, denen eine tempe-

raturunabhängigen Energieverteilung $g(E)$ mit Arrheniusabhängigkeit der mittleren Korrelationszeit zugrunde liegt. In diesem Szenario sind Korrelationszeitenverteilung und Energieverteilung über

$$G(\ln \tau) = k_B T g(k_B T \ln(\tau/\tau_0)) \quad (3.68)$$

miteinander verknüpft und der Gewichtungsfaktor kann zu

$$W(T) = \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{E - E_m}{\sqrt{2}\sigma_E} \right) \right] \equiv \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{T - T_m}{\sqrt{2}\sigma_T} \right) \right] \quad (3.69)$$

umgeschrieben werden. Aus der Ableitung des Gewichtungsfaktors nach der Temperatur

$$\frac{dW(T)}{dT} = k_B \ln[1/(\delta\tau_0)] g(E^*) \quad (3.70)$$

kann direkt die Energieverteilung $g(E^*)$ mit $E^* = -k_B T \ln(\delta\tau_0)$ bestimmt werden.²³⁷ Geht man stattdessen von einer Verteilung von Korrelationszeiten mit temperaturunabhängiger Form aus, d. h. $\sigma(T) = \text{const.}$, kann bei bekannter Temperaturabhängigkeit der mittleren Korrelationszeit τ_m aus $W(T)$ die Verteilungsbreite bestimmt werden.

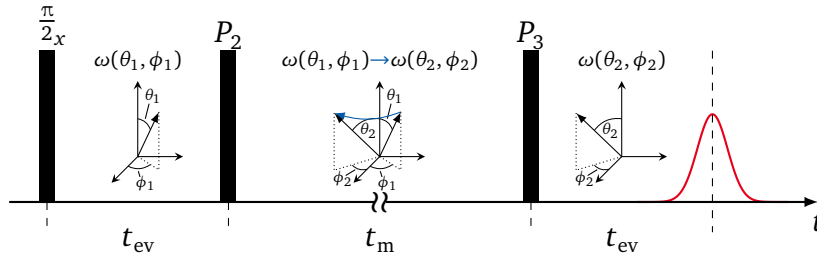


Bild 3.13: Schematische Darstellung der Stimulierten-Echo-Pulsfolge mit den im Text benutzten Orientierungen.

Mithilfe des Stimulierten-Echo-Experiments ist es möglich, Zugang zu Korrelationszeiten zu erhalten, die länger sind als die inverse Kopplungskonstante. Dies wird experimentell durch die in Bild 3.13 abgebildete Pulsfolge ermöglicht. Dabei werden zwei Orientierungen $\Omega_1 = (\theta_1, \phi_1)$ und $\Omega_2 = (\theta_2, \phi_2)$ zu Zeitpunkten 0 und t_m durch die entsprechenden Phasen $\Phi(t) = \omega[\Omega(t)] \cdot t_{ev}$ kodiert und deren Korrelation in Abhängigkeit von der Mischzeit t_m ausgewertet. Je nach Wahl der Dauer und Phase der Pulse P_2 und P_3 ergibt sich das Zeeman-Experiment ($P_2 = 90^\circ_x$; $P_3 = 90^\circ_x$)²⁴¹ mit der Korrelationsfunktion

Stimuliertes
Echo

$$F^{cc}(t_m, t_{ev}) = \langle \cos[\omega_Q(0)t_{ev}] \cdot \cos[\omega_Q(t_m)t_{ev}] \rangle \quad (3.71a)$$

oder das Spin-Alignment-Experiment ($P_2 = 45^\circ$; $P_3 = 45^\circ$)²⁴² mit der Korrelationsfunktion

$$F^{ss}(t_m, t_{ev}) = \langle \sin[\omega_Q(0)t_{ev}] \cdot \sin[\omega_Q(t_m)t_{ev}] \rangle. \quad (3.71b)$$

Das gemessene Signal des Korrelationsverlustes in Abhängigkeit von der Mischzeit t_m lässt sich als gestreckt exponentieller Abfall auf ein Plateau F_∞

$$F(t_m, t_{ev}) \propto (1 - F_\infty(t_{ev})) \exp \left[- \left(\frac{t_m}{\tau(t_{ev})} \right)^{\beta(t_{ev})} \right] + F_\infty(t_{ev}) \quad (3.72)$$

beschreiben.[‡] Relaxationseffekte während der Mischzeit führen dazu, dass der tatsächliche Signalabfall zusätzlich mit $\exp[-(t_m/T_1)^{\beta_{T1}}]$ gedämpft wird. Hier ist allerdings zu beachten, dass der Relaxationsterm nur für das Zeeman-Experiment aus der entsprechenden T_1 -Messung übernommen werden kann. Grund dafür sind die unterschiedlichen Zustände, die zur Speicherung der Phaseninformation während der Mischzeit herangezogen werden. Während im Zeeman-Experiment der Zustand \hat{I}_z , der mit T_1 relaxiert, als Speicherzustand dient, wird im Fall des Spin-Alignment-Experiments der Zustand $\hat{T}_{20} \propto 3\hat{I}_z^2 - \hat{I}^2$ ²⁰⁶ verwendet. Dieser Zustand besitzt die Relaxationszeit T_{1Q} , der für $I = 1$ über

$$\langle T_{1Q}^{-1} \rangle = 3C \cdot J_2(\omega_L) \quad (3.73)$$

von der spektralen Dichte abhängt.²⁴² Die Relaxationszeit T_{1Q} ist in der gleichen Größenordnung wie T_1 ,²⁴² muss aber mit dem dazugehörigen Streckungsparameter β_Q zusammen mit den Parametern des Korrelationsabfalls angepasst werden. Da für sehr kurze Evolutionszeiten das Signalmaximum durch die Totzeit des letzten Pulses nicht zu detektieren ist, muss in diesen Fällen der dritte Puls durch ein Festkörperecho ersetzt werden.²⁴³

Die Parameter der Korrelationsfunktion, die Korrelationszeit τ , der Streckungsparameter β und das Endplateau F_∞ , sind abhängig von der gewählten Evolutionszeit (Bild 3.14). Während für großwinklige Reorientierung wie Tetraedersprünge die Korrelationszeiten nahezu konstant sind, zeigt Kleinwinkeldynamik eine deutlich stärkere Abhängigkeit von der Evolutionszeit. Das Endplateau F_∞ kann ebenfalls Aufschluss über die Reorientierungsdynamik geben, beispielsweise wird bei einer endlichen Anzahl von n möglichen Positionen ein Abfall auf $F_\infty = 1/n$ beobachtet. Durch Variation der Evolutionszeit kann so eine Unterscheidung zwischen Bewegungsmodellen möglich sein.^{53,244,245}

[‡] Wenn aus dem Kontext deutlich wird, auf welches Experiment Bezug genommen wird, oder wenn eine Unterscheidung nicht notwendig ist, wird auf die Unterscheidung zwischen F^{cc} und F^{ss} verzichtet.

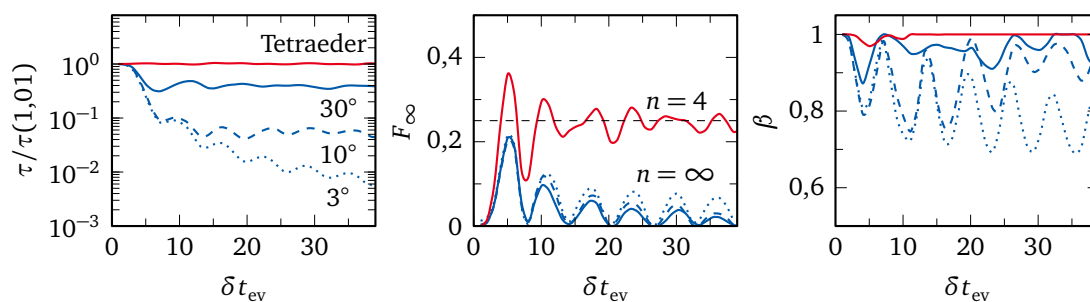


Bild 3.14: Evolutionszeitabhängigkeit der Parameter des Stimulierten Echos: Random-Walk-Simulationen des Spin-Alignment-Experiments für isotrope Reorientierung mit Sprungwinkeln 3° , 10° und 30° und für Tetraedersprünge bei einer Sprungzeit $\tau_j = 10^{-3}$ s und bei Anpassung mit Gleichung (3.72).

3.4 Untersuchung mit ^{13}C -NMR: CPMAS-Pulsfolge

Kohlenstoff besitzt mit ^{13}C nur ein einziges stabiles Isotop, das einen Spin ungleich Null besitzt und mit NMR-Methoden untersucht werden kann. Da Kohlenstoff einer der Hauptbestandteil organischer Verbindungen ist, wird ^{13}C daher trotz seiner geringen natürlichen Häufigkeit von 1,1 % genutzt, um Aussagen über Struktur und Dynamik solcher Systeme machen zu können. Zusätzlich ist es durch die isotrope chemische Verschiebung des ^{13}C -Kerns möglich, die Dynamik unterschiedlicher Struktureinheiten getrennt voneinander zu untersuchen, was gerade in Proteinsystem von Interesse ist. Allerdings weist die ^{13}C -Festkörper-NMR Probleme auf, auf deren experimentelle Lösungen in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

Aus der geringen Häufigkeit folgt eine geringe Signalintensität, die experimentell zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis und zu langen Messzeiten führt. Zusätzlich bedingt eine geringere Relaxationsstärke eine lange T_1 -Zeit und damit eine lange Wartezeit zwischen Einzelakkumulationen und erhöht die Messdauer weiter. Dieses Problem kann umgangen werden, indem durch sog. Kreuzpolarisation (engl. cross polarization, CP) die Intensität gesteigert wird. Auch der eingangs erwähnte Punkt, Struktureinheiten getrennt betrachten zu können, ist nur mithilfe zusätzlicher experimenteller Methoden zu erreichen. Andernfalls treten nicht ausgemittelte anisotrope Beiträge der dipolaren Kopplung und der chemischen Verschiebung auf und lediglich eine Überlagerung breiter Linien ist beobachtbar. Eine künstliche Mittelung durch Rotation der untersuchten Systeme, Magic Angle Spinning (MAS) genannt, und Entkopplung dipolar gekoppelter Spinbäder erlauben jedoch eine Unterdrückung anisotroper Wechselwirkungen. Die CPMAS-Pulsfolge²⁴⁶ (Bild 3.15) ist die Kombination der verschiedenen Methoden, um die Probleme zu

lösen, die bei Messung des ^{13}C -Isotops auftreten. Diese Pulsfolge wurde bereits in zahlreichen Studien zur Proteindynamik verwendet.^{146,247–251}

Kreuz-
polarisation

Um die genannten Nachteile auszugleichen, kann Magnetisierung mit einer Pulsfolge wie in Bild 3.15 vom Spinsystem eines häufig auftretenden Isotops I mit großem gyromagnetischem Verhältnis (z. B. ^1H) auf das Spinsystem S des untersuchten Kerns übertragen werden.

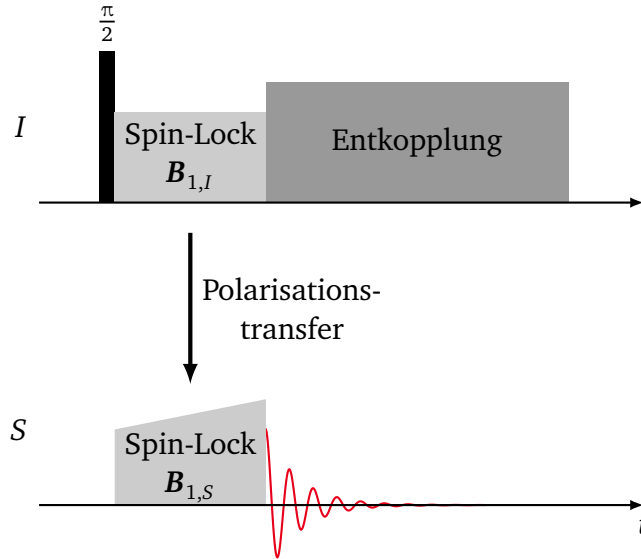


Bild 3.15: Schematische Darstellung der CPMAS-Pulsfolge. Durch die entlang der Transversalebene eingestrahlten Spin-Lock-Pulse befinden sich beide Spinbäder im thermischen Kontakt und durch dipolare Kopplung kann Magnetisierung vom Spinsystems I auf den untersuchten Spin S transportiert werden.

Der wirkende Hamiltonoperator, der während der Einstrahlung der RF-Pulse $B_{1,S}$ und $B_{1,I}$ für den Effekt der Kreuzpolarisation relevant ist, wird durch

$$\hat{\mathcal{H}} = \hat{\mathcal{H}}_Z + \hat{\mathcal{H}}_{\text{DD}} + \hat{\mathcal{H}}_{\text{RF}} \quad (3.74)$$

beschrieben. Im Term $\hat{\mathcal{H}}_Z$ ist die Zeeman-Wechselwirkung (Gleichung (3.28)) beider Spinsysteme I und S mit dem statischen Magnetfeld B_0 enthalten. Die Spinsysteme sind über die heteronukleare dipolare Wechselwirkung $\hat{\mathcal{H}}_{\text{DD}}$ (Gleichung (3.50b)) miteinander gekoppelt. Der Einfluss der eingestrahlten RF-Felder ist durch den Hamiltonoperator

$$\hat{\mathcal{H}}_{\text{RF}} = 2\gamma_I B_{1,I} \hat{I}_x \cos(\omega_{0,I} t) + 2\gamma_S B_{1,S} \hat{S}_x \cos \omega_{0,S} t \quad (3.75)$$

mit der Amplitude $\gamma_i B_{1,i} \equiv \omega_{1,i}$ und der Frequenz $\omega_{0,i}$ des Pulses im Spinsystem i gegeben.[§]

Der Einfluss der äußeren Felder wird durch einen zweifachen Wechsel des Koordinatensystems deutlich. Der erste Wechsel erfolgt in das doppelt-rotierende Koordinatensystem mit Hamiltonoperator

$$\begin{aligned}\hat{\mathcal{H}}_{\text{rot}} &= \hat{R}_0^{-1} \hat{\mathcal{H}} \hat{R}_0 + \omega_{0,I} \hat{I}_z + \omega_{0,S} \hat{S}_z \\ &= \hat{\mathcal{H}}_{\text{DD}} - \omega_{1,I} \hat{I}_x - \omega_{1,S} \hat{S}_x,\end{aligned}\quad (3.76)$$

der den Rotationsoperator $\hat{R}_0 = e^{-i\omega_{0,I}\hat{I}_z t} e^{-i\omega_{0,S}\hat{S}_z t}$ enthält und in dem die Zeitabhängigkeit der Spin-Lock-Pulse entfällt. Eine zweite Transformation, die den Einfluss der RF-Pulse ausblendet, mit Rotationsoperator $\hat{R}_1 = e^{-i\omega_{1,I}\hat{I}_x t} e^{-i\omega_{1,S}\hat{S}_x t}$ führt nun zum Hamiltonoperator

$$\hat{\mathcal{H}}' = \hat{R}_1^{-1} \hat{\mathcal{H}}_{\text{rot}} \hat{R}_1 + \omega_{1,I} \hat{I}_x + \omega_{1,S} \hat{S}_x. \quad (3.77)$$

Werden Beiträge vernachlässigt, die im zeitlichen Mittel während der Dauer der Spin-Lock-Pulse verschwinden, ist der Hamiltonoperator nach diesen Transformationen

$$\hat{\mathcal{H}}' = \omega_{IS} \left[(\hat{I}_z \hat{S}_z + \hat{I}_y \hat{S}_y) \cos(\omega_{1,I} - \omega_{1,S}) t + (\hat{I}_y \hat{S}_z + \hat{I}_z \hat{S}_y) \sin(\omega_{1,I} - \omega_{1,S}) t \right]. \quad (3.78)$$

Werden die Feldstärken der Spin-Lock-Pulse so gewählt, dass sie die Hartmann-Hahn-Bedingung²⁵²

$$\gamma_I B_{1,I} = \gamma_S B_{1,S} \Leftrightarrow \omega_{1,I} = \omega_{1,S} \quad (3.79)$$

erfüllen, kann zwischen beiden Spinsystem über Flip-Flop-Prozesse Magnetisierung ausgetauscht werden. Rotiert die Probe während der Spin-Lock-Pulse, muss im Hamiltonoperator aus Gleichung (3.78) die Zeitabhängigkeit der anisotropen Wechselwirkung (vgl. Gleichung (3.82)) berücksichtigt werden. In diesem Fall ist Polarisationstransfer unter der Bedingung²⁵³

$$\omega_I = \omega_S + n\omega_{\text{rot}}, \quad n \in \{0, \pm 1, \pm 2\} \quad (3.80)$$

gewährleistet.

Die Richtung des Polarisationstransfers vom Spinsystem I zum Spinsystem S wird durch Einstrahlung eines 90° -Pulses vor dem Spin-Lock-Puls im Spinsystem I festgelegt. Dieser Puls garantiert, dass zu Beginn der Kontaktzeit zwischen den Spinbädern nur der Spin I eine Magnetisierung aufweist.

[§] Hier werden beide RF-Pulse entlang der x -Achse eingestrahlt, die Rechnung für andere Richtungen erfolgt aber analog.

Da die Hartmann-Hahn-Bedingung für einen effizienten Polarisationstransfer experimentell nicht immer erfüllt werden kann, gibt es methodische Weiterentwicklungen, um die Kreuzpolarisation unempfindlicher auf Fehleinstellungen zu machen.^{254–256} In dieser Arbeit wurde dafür an Stelle eines konstanten Feldes $B_{1,C}$ die Stärke kontinuierlich variiert.²⁵⁴

Die Erhöhung der Signalintensität ist abhängig von der Dauer der Kontaktzeit zwischen den Spinbädern. Im einfachsten Fall lässt sich die Zeitabhängigkeit durch²⁵⁷

$$S(t) = S_0 \left(1 - \frac{T_{CP}}{T_{1\rho}} \right) \left[\exp\left(-\frac{t}{T_{1\rho}}\right) - \exp\left(-\frac{t}{T_{CP}}\right) \right] \quad (3.81)$$

beschreiben, wobei S_0 die Intensität ohne Kreuzpolarisation ist. Das Maximum wird durch die Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden Koordinatensystem $T_{1\rho}$ und die Zeitkonstante T_{CP} , die ein Maß für die dipolare Kopplung zwischen ^{13}C und ^1H ist, bestimmt. Als Beispiel hierfür ist in Bild 3.16 die Signalintensität der

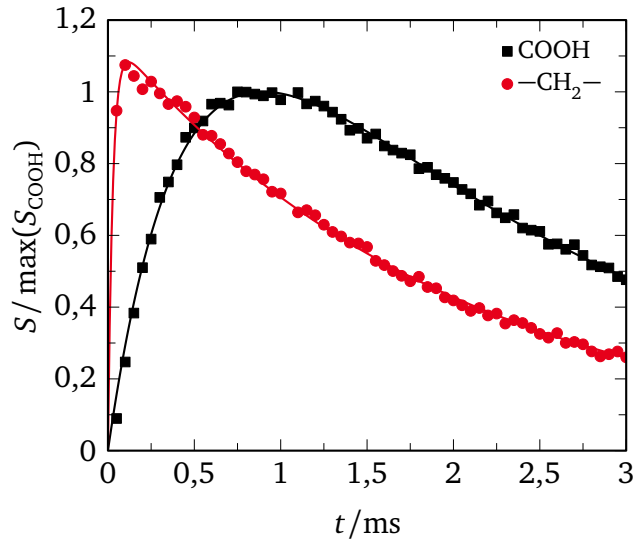


Bild 3.16: Signalintensität von Glycin in Abhängigkeit von der Dauer der Kreuzpolarisation. Linien sind Anpassungen nach Gleichung (3.81) an die Messdaten.

^{13}C -Resonanzen von Glycin in Abhängigkeit von der Kontaktzeit aufgetragen. Man erkennt deutlich den Unterschied zwischen den Kohlenstoffen mit ihren unterschiedlichen Transferzeiten T_{CP} . Während die CH_2 -Gruppe bereits nach 10^{-4} s eine Signalerhöhung durch Kreuzpolarisation erfahren hat, ist die dipolare Kopplung des Kohlenstoffatoms der Carboxylgruppe, das keine direkt gebundenen Protonen besitzt, schwächer und benötigt eine zehn Mal so lange Kontaktzeit für maximale

Signalerrhöhung. Diese Abhängigkeit des Polarisationsstransfers vom Bindungstyp und der Verfügbarkeit von Protonen in Kohlenstoffnähe führt daher dazu, dass die Signalintensität von ^{13}C -Spektren, die mit Kreuzpolarisation aufgenommen wurden, keine Rückschlüsse auf die Zahl der entsprechenden Kohlenstoffatome zulässt.

Die Herleitung des Hamiltonoperators in Gleichung (3.78) und damit der Effekt der Kreuzpolarisation ist von der Annahme ausgegangen, dass keine dynamischen Prozesse auftreten, die die Kopplungsstärke ω_{IS} der heteronuklearen dipolaren Kopplung auf der Zeitskala des Polarisationsstransfers beeinflussen. Untersuchungen des Einflusses von Dynamik auf Polarisationsstransfer haben gezeigt, dass Bewegungen mit Bewegungsraten in der Größenordnung von etwa 10^5 s^{-1} zu einer deutlichen Reduzierung der gemessenen Signalintensität führen.^{258,259}

Um auch in dynamischen Bereichen, in denen keine Mittelung anisotroper Wechselwirkungen durch Bewegung mehr stattfindet, eine hohe Auflösung zu erlangen, kann eine künstliche Mittelung durch ausreichend schnelle Rotation der gegenüber dem äußeren Magnetfeld geneigten Probe erzeugt werden.^{260,261} Dieses Verfahren wird als Magic Angle Spinning (MAS) bezeichnet.

Magic Angle Spinning

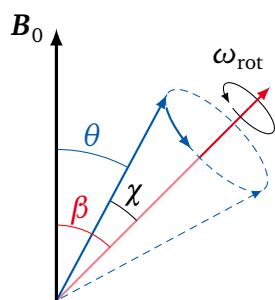


Bild 3.17: Schematische Darstellung der Orientierungen unter Magic Angle Spinning. Rot: Ausrichtung der Rotationsachse bzgl. des äußeren Magnetfelds; blau: Orientierung der Hauptachse mit dem größten Hauptwert der Wechselwirkung.

Ist die Rotationsachse der Probe gegenüber dem äußeren Magnetfeld B_0 um den Winkel β geneigt, kann der Winkel θ , der die Ausrichtung des Wechselwirkungstensors gegenüber dem äußeren Magnetfeld beschreibt, bei Rotation mit Kreisgeschwindigkeit ω durch

$$\cos \theta = \cos \beta \cos \chi + \sin \beta \sin \chi \cos(\omega t) \quad (3.82)$$

ausgedrückt werden (vgl. Bild 3.17). Hierbei bezeichnet der Winkel χ den Neigungswinkel zwischen der ausgezeichneten Hauptachse des Wechselwirkungstensors und der Rotationsachse. Um die Zeitabhängigkeit des zweiten Legendre-Polynoms, das die Orientierungsabhängigkeit der auftretenden lokalen Wechselwirkungen

beschreibt, besser einordnen zu können, wird Gleichung (3.82) quadriert:

$$\begin{aligned}\cos^2 \theta &= \cos^2 \beta \cos^2 \chi + \frac{1}{2} \sin^2 \beta \sin^2 \chi \\ &+ \frac{1}{2} \sin 2\beta \sin 2\chi \cos(\omega t) \\ &+ \frac{1}{2} \sin^2 \beta \sin^2 \chi \cos(2\omega t) .\end{aligned}\quad (3.83)$$

Die ersten beiden Term sind konstant und führen experimentell zu einer Änderung der Wechselwirkungsstärke. Die letzten beiden Terme sind periodisch mit Mittelwert Null und führen in Spektren zu den sogenannten Rotationsseitenbanden. Die zeitliche Mittelung des zweiten Legendre-Polynoms, ist durch

$$\overline{3 \cos^2 \theta - 1} = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \beta - 1) (3 \cos^2 \chi - 1) \quad (3.84)$$

gegeben. Die Kopplungsstärke ist abhängig vom Neigungswinkel der Rotationsachse β und skaliert mit dem Faktor $\frac{1}{2} (3 \cos^2 \beta - 1)$. Im Fall des Winkels $\beta = 54^\circ 44'$, dem magischen Winkel, führt dies zu einer vollständigen Unterdrückung anisotroper Wechselwirkungen. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche zeitliche Mittelung ist eine ausreichend schnelle Rotation ω im Vergleich zur effektiven Kopplungsstärke δ der Wechselwirkung.

Wie andere experimentelle Methoden, die lokale Wechselwirkungen beeinflussen, ist die Effizienz des Magic Angle Spinings auf interne Dynamik sensitiv. Für die benutzte Drehfrequenz von 6 kHz bedeutet das, dass Dynamik mit Korrelationszeiten auf der Zeitskala $\tau \approx 10^{-4}$ s die Mittelung durch die Drehung beeinflusst wird, was im Allgemeinen Auswirkungen auf Linienbreite und Signalintensität hat.^{262,263}

Heteronukleare Entkopplung

Wenn (wie in dieser Arbeit) die Drehgeschwindigkeit ω_{rot} die Kopplungsstärke ω_{IS} nicht übersteigt, kann die heteronukleare dipolare Kopplung durch Magic Angle Spinning nicht vollständig ausgemittelt werden. In diesem Fall müssen die Spinbäder während der Signalaufnahme (vgl. Bild 3.15) voneinander entkoppelt werden, um eine geringe Linienbreite zu erhalten. Zwar haben sich in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Varianten entwickelt zur Entkopplung der Spinsysteme,^{264–268} abhängig vom Ziel der Untersuchungen kann die einfachste Art der Entkopplung, die Continuous-Wave(CW)-Entkopplung²⁶⁹ ausreichen.

Bei CW-Entkopplung wird im zu entkoppelnden Spinsystem beispielsweise entlang der x -Achse ein RF-Puls der Stärke B_1 eingestrahlt und verursacht eine Drehung mit Drehgeschwindigkeit $\omega_1 = \gamma_I B_1$ der Magnetisierung des Spins I um die Einstrahlachse. Die über die Einstrahldauer Δ_p gemittelte heteronukleare dipolare Kopplung

lässt sich in diesem Fall durch²⁰⁶

$$\overline{\hat{\mathcal{H}}_{\text{DD}}} = -\omega_{IS} \hat{S}_z \frac{1}{\omega_1 \Delta_p} \int_0^{\omega_1 \Delta_p} [\hat{I}_z \cos \omega_1 t + \hat{I}_y \sin \omega_1 t] d\omega_1 t \quad (3.85)$$

beschreiben. Für Einstrahldauern Δ_p , für die die Bedingung $\omega_1 \Delta_p = n \cdot 2\pi$ ($n \in \mathbb{N}$) erfüllt ist, wird die Kopplung zwischen den Spinsystemen aufgehoben. Durch den Vorfaktor $(\omega_1 \Delta_p)^{-1}$ tritt aber auch für lange Einstrahldauern, die nicht dieser Bedingung genügen, eine ausmittelnde Entkopplung ein.

Voraussetzung für die in Gleichung (3.85) gegebene zeitliche Mittelung ist eine Entkopplungsstärke ω_1 , die sowohl größer als die heteronukleare dipolare Kopplung ω_{IS} als auch die homonukleare dipolare Kopplung ω_{II} ist. Ebenfalls wurde eine mögliche Zeitabhängigkeit der Kopplungsstärke ω_{IS} durch Dynamik vernachlässigt. Ist die Bewegungsrate τ^{-1} vergleichbar zur Entkopplungsstärke ω_1 , weist die dipolare Kopplung ω_{IS} eine nicht-vernachlässigbare Zeitabhängigkeit auf und ist Teil des Integranden in Gleichung (3.85). Dies kann in einer dipolaren Restkopplung und damit in einer erhöhten Linienbreite resultieren.^{270,271}

3.5 Quasielastische Neutronenstreuung

Neben NMR-Experimenten wurde auch quasielastische Neutronenstreuung verwendet, um die Dynamik von Protein und Hydratwasser zu untersuchen. Als allgemeine Einführung zur quasielastischen Neutronenstreuung sei hier auf das Buch von Bée²⁰⁸ verwiesen, das einen Überblick zu Grundlagen und Anwendungen dieser Methode liefert.

Trifft ein Neutron mit Masse m_n auf Materie, wirken die Atomkerne als Streuzentren (Bild 3.18) und es kann sowohl ein Energie- als auch ein Impulsübertrag stattfinden:

Grundlagen

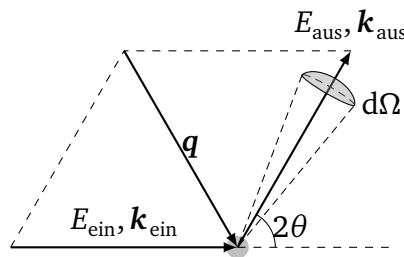


Bild 3.18: Schematische Darstellung eines Streueignisses.

$$\hbar\omega = E_{\text{aus}} - E_{\text{ein}} = \frac{\hbar^2}{2m_n}(k_{\text{aus}}^2 - k_{\text{ein}}^2), \quad (3.86a)$$

$$\hbar\mathbf{q} = \hbar(\mathbf{k}_{\text{aus}} - \mathbf{k}_{\text{ein}}). \quad (3.86b)$$

Charakterisiert wird dies durch den Energieübertrag ω und den Streuvektor $\mathbf{q} = \mathbf{k}_{\text{aus}} - \mathbf{k}_{\text{ein}}$. Anhand des Energieübertrags kann zwischen elastischer ($\omega = 0$) und inelastischer Streuung ($\omega \neq 0$) unterschieden werden. Indem der Energie- und Impulsübertrag zwischen Probe und gestreutem Neutron gemessen wird, lassen sich Informationen über Struktur- und Dynamik gewinnen.

Die Wechselwirkung zwischen Neutron am Ort \mathbf{r} und Streuzentrum am Ort \mathbf{R} wird dabei durch das Fermi-Pseudopotential

$$\hat{V}(\mathbf{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m_n} b \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}), \quad (3.87)$$

mit einer isotonenabhängigen Streulänge b beschrieben. Die Charakterisierung eines Materials erfolgt häufig über den Streuquerschnitt σ , der das Verhältnis zwischen Zahl der Neutronen I , die in einen Raumwinkel Ω pro Zeiteinheit gestreut werden, und eingehendem Neutronenfluss I_0 beschreibt:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{I}{I_0}. \quad (3.88)$$

Der Streuquerschnitt σ und die Streulänge b des Potentials sind über $\sigma = 4\pi\langle b^2 \rangle$ miteinander verknüpft. Die Energieabhängigkeit eines Streuereignisses wird durch den doppelt-differentiellen Streuquerschnitt wiedergegeben, der bei Beschreibung des Neutrons als ebene Welle durch

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{k_{\text{aus}}}{k_{\text{ein}}} \frac{1}{2\pi\hbar} \sum_{i,j} \langle b_i b_j \rangle \int_{-\infty}^{\infty} \langle \exp[i\mathbf{q}(\mathbf{R}_j(t) - \mathbf{R}_i(0))] \rangle \exp(-i\omega t) dt \quad (3.89)$$

gegeben ist, wobei hier eine Summation über alle N Streuzentren an den Orten $\mathbf{R}_i(t)$ vorgenommen wird. Werden der kohärente und inkohärente Streuquerschnitt

$$\sigma = \sigma_{\text{koh}} + \sigma_{\text{ink}} = 4\pi\langle b \rangle^2 + 4\pi(\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2) \quad (3.90)$$

eingeführt, lässt sich Gleichung (3.89) als Streufunktion

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{N}{4\pi} \frac{k_{\text{aus}}}{k_{\text{ein}}} [\sigma_{\text{koh}} S_{\text{koh}}(\mathbf{q}, \omega) + \sigma_{\text{ink}} S_{\text{ink}}(\mathbf{q}, \omega)] \quad (3.91)$$

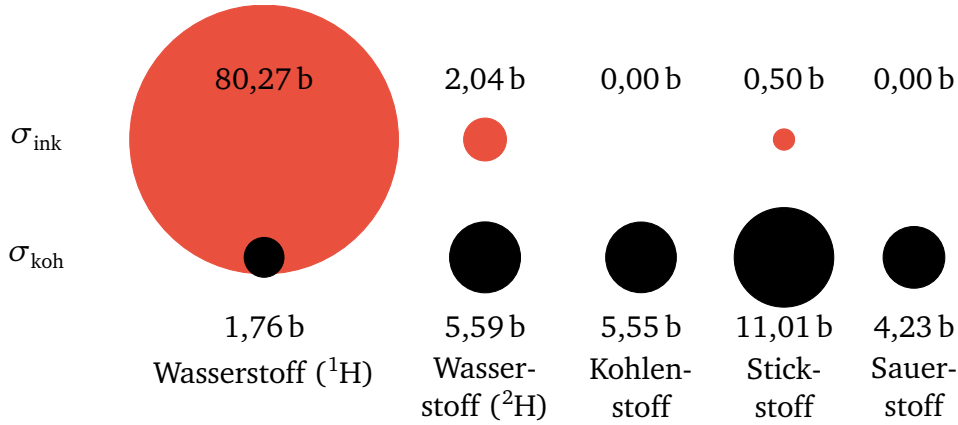


Bild 3.19: Streuquerschnitte verschiedener Isotope/Atome.²⁷²

mit

$$S_{\text{koh}}(\mathbf{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi\hbar N} \sum_{i,j} \int_{-\infty}^{\infty} \langle \exp[i\mathbf{q}(\mathbf{R}_j(t) - \mathbf{R}_i(0))] \rangle \exp(-i\omega t) dt, \quad (3.92a)$$

$$S_{\text{ink}}(\mathbf{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi\hbar N} \sum_i \int_{-\infty}^{\infty} \langle \exp[i\mathbf{q}(\mathbf{R}_i(t) - \mathbf{R}_i(0))] \rangle \exp(-i\omega t) dt \quad (3.92b)$$

ausdrücken.

In den hier untersuchten Systemen wird hauptsächlich inkohärente Streuung am Wasserstoffisotop ^1H detektiert, da dessen inkohärenter Streuquerschnitt deutlich größer ist als kohärente oder inkohärente Beiträge anderer Isotope (vgl. Bild 3.19). Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden durch gezielte Deuterierung die Beiträge bestimmter Komponenten zur Streuung zu unterdrücken und damit effektiv auszublenden.^{132,273–275}

Gleichung (3.92b) ist die zeitliche Fouriertransformation der intermediären Streufunktion

$$I_{\text{ink}}(\mathbf{q}, t) = \frac{1}{N} \sum_i \langle \exp[i\mathbf{q}(\mathbf{R}_i(t) - \mathbf{R}_i(0))] \rangle, \quad (3.93)$$

die wiederum durch räumliche Fouriertransformation mit dem Selbst-Anteil der Van-Hove-Korrelationsfunktion (Gleichung (3.6)) verbunden ist.

In dieser Arbeit wurden quasielastische Streuexperimente durchgeführt, deren inkohärente Streuintensität sich in die Summe aus elastischem und quasielastischem Beitrag

$$S(\mathbf{q}, \omega) = S_{\text{el}}(\mathbf{q}, \omega) + S_{\text{qe}}(\mathbf{q}, \omega) = A_0(\mathbf{q})\delta(\omega) + (1 - A_0(\mathbf{q}))L(\mathbf{q}, \omega) \quad (3.94)$$

aufspalten lässt, wobei sich der quasielastische Anteil im einfachsten Fall durch eine Lorentzlinie beschreiben lässt. Der Faktor $A_0(\mathbf{q})$ ist der elastische inkohärente Strukturfaktor, der durch den Anteil der elastischen Intensität an der Gesamtintensität $S_{\text{el}}/(S_{\text{el}} + S_{\text{qe}})$ definiert ist und dessen Abhängigkeit vom Streuvektor \mathbf{q} durch das zugrunde liegenden Bewegungsmodell bestimmt ist. An dieser Stelle nicht berücksichtigt wurde der Beitrag des Lamb-Mössbauer-Faktors,[¶] der in einem exponentiellen Vorfaktor $\exp(-q^2 \langle u^2 \rangle)$ von $S(\mathbf{q}, \omega)$ resultiert. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass Spektrometer eine endliche Energieauflösung $\Delta\omega$ besitzen. Der experimentell gemessene Strukturfaktor $S_{\text{res}}(\mathbf{q}, \omega)$ berücksichtigt dies durch Faltung mit einer Auflösungsfunktion $R(q, \omega, \Delta\omega)$:

$$S_{\text{res}}(\mathbf{q}, \omega) = S(\mathbf{q}, \omega) \otimes R(q, \omega, \Delta\omega). \quad (3.95)$$

Rückstreu-
spektrometer

Die Neutronenstreuexperimente wurden am Rückstreu-spektrometer SPHERES am FRM-II in München durchgeführt. Rückstreu-spektrometer wie das verwendete zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Energieauflösung sehr gut ist, so dass auch Energieüberträge im Bereich von μeV detektiert werden können. Die hohe Auflösung wird dadurch erreicht, dass die Neutronen sowohl vor dem Passieren der Probe am Monochromatorkristall als auch nach dem Passieren an den Analysatoren im größtmöglichen Streuwinkel von $\theta = 90^\circ$ gestreut werden. Dieser Streuwinkel folgt aus der Bragg-Bedingung, wonach Neutronen mit Wellenlänge λ , die im Einfallswinkel θ auf einen Kristall mit Gitterebenenabstand d treffen, nur dann gestreut werden, wenn die Bedingung

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (3.96)$$

erfüllt ist. Die relative Energieauflösung ergibt sich durch Ableitung der Bragg-Bedingung und ist

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{2\Delta\lambda}{\lambda} = 2 \cot \theta \Delta\theta + \frac{2\Delta d}{d}. \quad (3.97)$$

Bei Rückstreuung ($\theta = 90^\circ$) wird diese lediglich durch Unregelmäßigkeiten Δd des Kristalls bestimmt.

Der schematisch dargestellte Aufbau des Spektrometers in Bild 3.20 lässt sich wie folgt beschreiben: Nachdem die Bandbreite des eingehenden Neutronenstrahls durch einen Geschwindigkeitsselektor vorreduziert wurde, trifft der Strahl auf einen Phasenraumtransformationschopper. Dieser reflektiert den Strahl in Richtung des Monochromators und ändert gleichzeitig den Strahl im Phasenraum um eine möglichst hohe Effizienz der Reflektion am Monochromatorkristall zu erreichen. Der Monochromatorkristall selbst kann durch einen Schrittmotor mit variabler

[¶]Der Lamb-Mössbauer-Faktor inkohärenter Streuung entspricht dem bekannteren Debye-Waller-Faktor kohärenter Streuung.

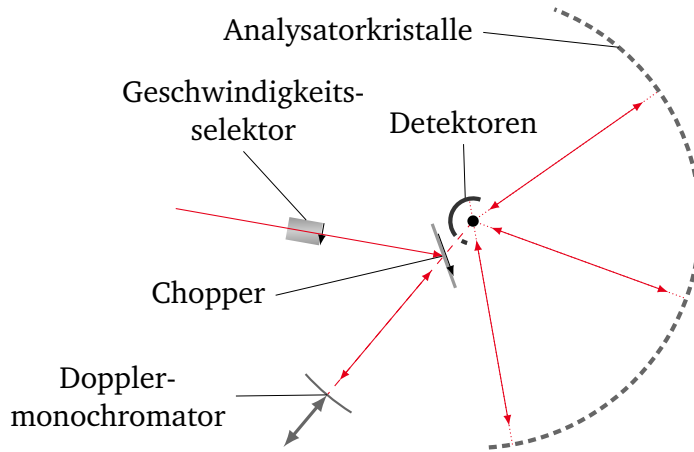


Bild 3.20: Aufbau eines Rückstreuspektrometers.

Geschwindigkeit v_d bewegt werden. Durch Dopplereffekt beträgt die Energie der Neutronen nach Reflektion am Kristall

$$E = E_0 + 2 \frac{v_d}{v_n} E_0, \quad (3.98)$$

wobei E_0 die Energie der Neutronen vor dem Auftreffen auf den Monochromator ist und v_n deren Geschwindigkeit. Die spektrale Breite des messbaren Spektrums $S(q, \omega)$ kann durch Einstellung der Dopplergeschwindigkeit v_d festgelegt werden. Nach der Streuung am Monochromator treffen die Neutronen auf die Probe und werden gestreut, wobei ein Impuls- und Energieübertrag auftreten kann. Die gestreuten Neutronen treffen auf Analysatorkristalle, wo sie ein zweites Mal unter der Rückstreubedingung erneut zur Probe hin reflektiert werden. Die Analysatorkristalle, die den Raumwinkel $d\Omega$ abdecken, stellen sicher, dass nur solche Neutronen, die Braggbedingung erfüllen, die durch den Streuprozesses eine Energieänderung um den Dopplerbeitrag erfahren haben. Bevor die Neutronen die Detektoren erreichen, können sie ein zweites Mal die Probe durchqueren, eine zweite Streuung ist aber aufgrund deren geringen Wahrscheinlichkeit jedoch vernachlässigbar. Aus dem bei Detektion bekannten Streuwinkel ϕ lässt sich der Betrag des Streuvektors

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\phi}{2} \quad (3.99)$$

bestimmen.

Beispielhaft ist in Bild 3.21 der Strukturfaktor $S(q, \omega)$ von Elastin für eine Temperatur von 150 K gezeigt. Man erkennt im Bereich um 0 μeV den durch die Auflösung verbreiterten elastischen Anteil und zusätzliche quasielastische Beiträge mit $\omega \neq 0$. Aus diesen gemessenen Spektren werden in dieser Arbeit zwei Größen gewonnen,

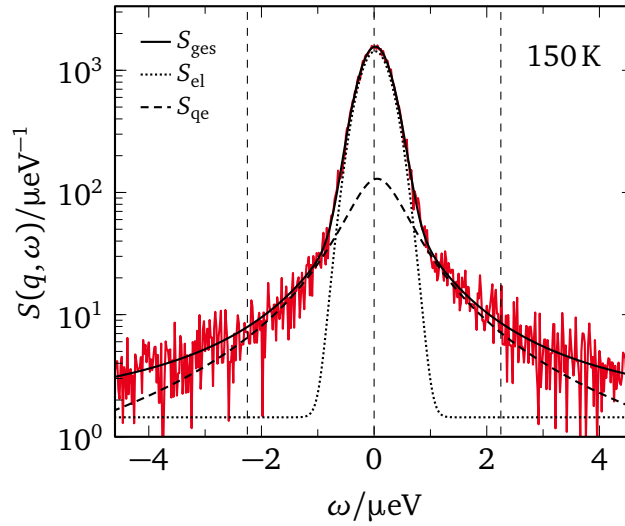


Bild 3.21: Strukturfaktor trockenen Elastins bei 150 K. Die durchgezogene schwarze Linie ist die Anpassung an die Messdaten, blaue Linien zeigen die elastischen und quasielastischen Anteile S_{el} und S_{qe} . Gestrichelte schwarze Linien zeigen die Abgreifpunkte für das mittlere Verschiebungsquadrat ($\omega = 0$ μeV) und die quasielastische Intensität ($|\omega| = 2,25$ μeV) an.

um Dynamik zu charakterisieren, das mittlere Verschiebungsquadrat und die inelastische Fensterintensität. Beide Methoden liefern eine Temperaturabhängigkeit bei einem festen Energieübertrag. Durch die Einschränkung auf einen geringen Energiebereich von $\pm 4,6$ μeV und kurzen Messdauern pro Temperatur ist es möglich gewesen, innerhalb eines kurzen Zeitraums eine Übersicht über die Temperaturabhängigkeit der Dynamik zu erhalten.

Mittleres
Verschiebungs-
quadrat

Das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ ist eine häufig genutzte Größe zur Untersuchung des Einflusses von Lösungsmitteln auf die Dynamik von Proteinen, an dessen Temperaturabhängigkeit die Herkunft des dynamischen Übergangs diskutiert wird.^{15,101,154,162} Dieses lässt sich aus der intermediären Streufunktion bei Annahme harmonischer Bewegung um die Gleichgewichtslagen der Kerne gewinnen:

$$S(q, \omega \approx 0) = \exp\left(-\frac{1}{3}\langle x^2 \rangle q^2\right) \quad (3.100)$$

$$\langle x^2 \rangle = \lim_{q \rightarrow 0} \frac{-3 \ln[S(q, 0)]}{q^2} \quad (3.101)$$

An Stelle des Faktors $1/3$ in Gleichung (3.100) findet man in der Literatur auch $1/6$ ²⁷⁶ oder Eins.¹⁶³ Da der gemessene Strukturfaktor $S_{res}(q, \omega)$ von der Auflösung $\Delta\omega$ des Spektrometers abhängt (Gleichung (3.95)), wird folglich auch das über Gleichung (3.101) berechnete mittlere Verschiebungsquadrat von der Spektrometer-

auflösung beeinflusst.^{277,278} Daraus folgt, dass das mittlere Verschiebungsquadrat empfindlich auf Bewegung auf der Zeitskala der experimentellen Auflösung, für SPHERES also im Nanosekundenbereich. Das mittlere Verschiebungsquadrat hängt im Fall harmonischer Bewegung linear von der Temperatur ab, wobei die inverse Steigung als effektive Federkonstante zum quantitativen Vergleich der Proteindynamik interpretiert worden ist.²⁷⁹ Gleichung (3.100) ist gültig, so lange die Annahme einer Gauß-Verteilung für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit um die Gleichgewichtsposition erfüllt ist. Als mögliche Ursachen für eine Abweichung von der harmonischen Näherung werden u. a. dynamische Heterogenitäten (und damit eine Verteilung von mittleren Verschiebungsquadraten) angeführt.¹⁷⁶ Wird die Verteilung von mittleren Verschiebungsquadraten als Korrektur berücksichtigt, lässt sich die Verbindung zwischen Strukturfaktor und mittlerem Verschiebungsquadrat als

$$S(q, 0) \approx \exp\left(-\frac{1}{3}q^2\langle x^2 \rangle\right) \left(1 + \frac{q^4}{36}\sigma^2\right) \quad (3.102)$$

finden,¹⁷⁶ wodurch zusätzlich Aussagen über die Varianz σ^2 der Verteilung gemacht werden können.

Aus den quasielastischen Beiträgen können nicht nur über die Temperaturabhängigkeit, sondern auch über die Art der Dynamik Informationen gewonnen werden. Diese Analyse wurde bereits erfolgreich zur Beschreibung der Dynamik in Proteinen angewendet.^{101,142} Bei Messung der inelastischen Fensterintensität wird die Signalintensität bei einem festen Energieoffset ω_{off} untersucht. Wie bereits im Zusammenhang mit Gleichung (3.94) erwähnt wurde, wird der quasielastische Beitrag im einfachsten Fall durch eine einfache Lorentz-Funktion mit Korrelationszeit τ durch

$$J(\omega, \tau) = \frac{\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (3.103)$$

und die Streuintensität durch

$$L^{\omega_{\text{off}}}(q) := S_{\text{qe}}(q, \omega_{\text{off}}) = C \frac{\tau}{1 + (\omega_{\text{off}}\tau)^2} = C \cdot J(\omega_{\text{off}}, \tau) \quad (3.104)$$

beschrieben, wobei in den Vorfaktor der C Einflüsse wie beispielsweise der elastische inkohärente Strukturfaktor $A(q)$ eingehen. Diese Methode weist Ähnlichkeiten zur Analyse von Spin-Gitter-Relaxationsraten auf,²⁸⁰ die bei fester Larmorfrequenz über

$$\langle T_1^{-1} \rangle = C [J(\omega_L, \tau) + 4J(2\omega_L, \tau)] \quad (3.105)$$

mit der spektralen Dichte $J(\omega)$ verknüpft sind. Wie auch bei Messungen der Spin-Gitter-Relaxation ändert sich die Höhe der beobachteten Größe mit der Temperatur durch die Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeit. Diese Abhängigkeit der Si-

Quasielastische
Intensität

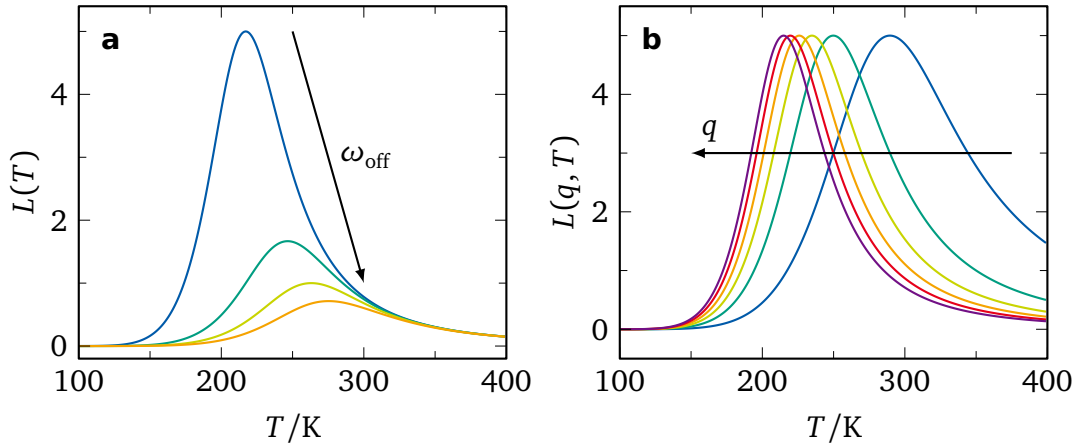


Bild 3.22: (a) Abhängigkeit der quasielastischen Intensität von der Wahl des Energieoffsets ω_{off} bei gleicher Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeit; (b) Abhängigkeit der quasielastischen Intensität vom Streuvektor bei freiem diffusiven Prozess. Die Richtung der Pfeile geben die Richtung der steigenden Werte an.

gnalintensität $L(T)$ ist in Bild 3.22 dargestellt. Für diese Kurven wurde ein einfaches Arrheniusverhalten für die Korrelationszeit angenommen. Bei einem Debye-Prozess lässt sich die Temperatur des Signalmaximums in Abhängigkeit von der Aktivierungsenergie E_a und dem Vorfaktor τ_0 der Korrelationszeit direkt als

$$T_{\text{max}} = \frac{-E_a}{k_B \ln(\omega_{\text{off}} \tau_0)} \quad (3.106)$$

berechnen.²⁸¹ Sie kennzeichnet analog zur NMR den Bereich, in dem $\omega_{\text{off}} \tau \approx 1$ gilt. Allerdings ist durch die Abhängigkeit von mehr als einem Parameter selbst für diesen einfachen Fall ohne Vorkenntnis alleine aus T_{max} keine eindeutige Bestimmung von Korrelationszeiten möglich. Wie in Bild 3.22a ebenfalls zu erkennen ist, hängt die Position und die Höhe von der Wahl des beobachteten Energieübertrags ab, wobei das Signalmaximum mit Vergrößerung des Übertrags zu höheren Temperaturen verschiebt mit geringer werdender Intensität.

Anders als in der Auswertung der NMR-Messung lässt sich in der Neutronenstreuung anhand der Abhängigkeit vom Streuvektor zwischen lokaler und diffusiver Dynamik unterscheiden, wie Bild 3.22b zeigt. Dort ist ein freier diffusiver Prozess angenommen worden, dessen Diffusionskonstante $D(T)$ mit der Korrelationszeit über $\tau^{-1}(q, T) = D(T)q^2$ verknüpft ist. Die resultierende q -Abhängigkeit führt gemäß Gleichung (3.104) dazu, dass das beobachtete Signalmaximum mit steigendem Streuvektor zu niedrigeren Temperaturen verschoben ist.

3.6 Dielektrische Spektroskopie

Mithilfe dielektrischer Spektroskopie ist es möglich über einen breiten Frequenzbereich Reorientierungsdynamik zu beobachten, was auch zur Charakterisierung von Proteinsystemen angewendet wurde.^{127,282,283} Dies geschieht durch Beobachtung der Reorientierung elektrischer Dipole μ in einem zeitlich veränderlichen elektrischen Feld E .

In dielektrischen Materialien kann durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes E aufgrund bereits vorhandener Dipole oder induzierter Dipole eine Polarisierung P erzeugt werden. Die Polarisierung P ist bei Anlegen eines elektrischen Feldes $E(t)$ durch

$$P = \varepsilon_0(\varepsilon - 1)E = \varepsilon \chi E \quad (3.107)$$

mit der elektrischen Suszeptibilität χ und der elektrischen Permittivität ε gegeben. In isotropen Medien, wie sie auch hier in dieser Arbeit untersucht werden, ist aber eine Betrachtung der skalaren Größen χ bzw. ε ausreichend. Die Polarisierung P setzt sich hierbei aus einem Beitrag durch induzierte Dipole, der Verschiebungspolarisation P_v , und einem Beitrag durch die Reorientierung permanenter Dipole, der Orientierungspolarisation P_o , zusammen. Die Induktion von Dipolen durch Verschiebung der Elektronenhüllen gegenüber dem Kern geschieht auf einer Zeitskala von $\tau \sim 10^{-11}$ s und erfolgt damit für die relevante experimentelle Zeitskala instantan. Eine Aufspaltung in diese Bestandteile bei Anlegen eines konstanten elektrischen Feld lässt sich dabei durch

$$P = P_v + P_o = \varepsilon_0(\varepsilon_\infty - 1)E + \varepsilon_0\Delta\varepsilon E \quad (3.108)$$

ausdrücken, wobei hier die Variablen ε_∞ für die Ausrichtung induzierter Dipole bei sehr kurzen Zeiten (bzw. sehr hohen Frequenzen) und die dielektrische Relaxationsstärke $\Delta\varepsilon = \varepsilon - \varepsilon_\infty$ als Maß des Reorientierungsbeitrags eingeführt wurden. Zusätzlich kann die Bewegung freier Ladungsträger (z. B. Ionen) Beiträge zur dielektrischen Antwort geben (Gleichung (3.119)). Im Gleichgewichtszustand hängt P_o von der Ausrichtung der permanenten Dipolmomente μ im beobachteten Volumen V ab. Das Curie-Gesetz liefert

$$\Delta\varepsilon = \frac{1}{3k_B T \varepsilon_0} \frac{\sum_{i,j} \langle \mu_i \mu_j \rangle}{V}. \quad (3.109)$$

Die Korrelation der Dipole wird im Allgemeinen durch den Kirkwood-Faktor²⁸⁴

$$g = \frac{\sum_{i,j} \langle \mu_i \mu_j \rangle}{N\mu^2} = 1 + \frac{\sum_i \sum_{i < j} \langle \mu_i \mu_j \rangle}{N\mu^2} \quad (3.110)$$

parametrisiert, sodass die dielektrische Stärke aus Gleichung (3.109) als

$$\Delta\varepsilon = \frac{1}{3\varepsilon_0} g \frac{\mu^2}{k_B T} \frac{N}{V} \quad (3.111)$$

als Funktion der Dichte nichtwechselwirkender Dipolmomente μ ausgedrückt werden kann.

Befindet sich das System in einem Nicht-Gleichgewichtszustand, kann die Relaxation der Polarisation ins thermische Gleichgewicht im Fall linearer Antwort mittels der Korrelationsfunktion

$$C(t) = \frac{\langle \mathbf{P}(0) \mathbf{P}(t) \rangle}{\langle \mathbf{P}(0) \mathbf{P}(0) \rangle} = \frac{\sum_{i,j} \langle \mu_i(0) \mu_j(t) \rangle}{\sum_{i,j} \langle \mu_i(0) \mu_j(0) \rangle} \quad (3.112)$$

beschrieben werden. Bei Vernachlässigung des Einflusses von Kreuzkorrelationen und der Beschreibung der Orientierung des Dipolmomentes bezüglich des äußeren elektrischen Feldes über den Winkel θ , ergibt sich daraus

$$C(t) = \frac{1}{N\mu^2} \sum_i \frac{\langle \mu \cos[\theta_i(0)] \cdot \mu \cos[\theta_i(t)] \rangle}{\langle \cos^2 \theta_i(0) \rangle} = \frac{\langle \cos[\theta(0)] \cos[\theta(t)] \rangle}{\langle \cos^2 \theta(0) \rangle}. \quad (3.113)$$

Dies ist die Korrelationsfunktion $F_1(t)$, die das Legendre-Polynom erster Ordnung $P_1(\cos \theta) = \cos \theta$ zu zwei verschiedenen Zeitpunkten korreliert.

Neben der Reorientierung von Dipolmomenten kann es auch zu Beiträgen durch Ladungstransport kommen. Dies kann zum einen zu einem zusätzlichen Beitrag durch Gleichstromleitfähigkeit σ_{DC} führen, zum anderen können sich Ladungsträger an Grenzflächen anlagern und das effektive elektrische Feld ändern. Geschieht diese Ablagerung direkt an den Elektroden, wird dies als Elektrodenpolarisation bezeichnet, an internen Grenzflächen des Materials führt dies zu sog. Maxwell-Wagner-Sillars-(MWS-)-Prozessen.²⁰⁷ Beide Prozesse zeigen ähnliche Frequenzabhängigkeiten,²⁸⁵ lassen sich aber beispielsweise durch ihre Abhängigkeit von der Geometrie der Messzelle voneinander unterscheiden.

Experimentelle
Durchführung

Anstelle der Messung der Korrelationsfunktion in der Zeitdomäne wird meist in der Frequenzdomäne die entsprechende Suszeptibilität $\chi(\omega)$ bzw. die dielektrische Funktion $\varepsilon(\omega)$ gemessen. Der Probenbehälter inklusive Probenmaterial wird dafür innerhalb eines Stromkreises als Kondensator mit frequenzabhängiger Kapazität $C(\omega)$ aufgefasst, wie es schematisch in Bild 3.23 dargestellt ist. An diesen wird eine zeitlich veränderliche Spannung

$$U(\omega, t) = U_0 e^{i\omega t} \quad (3.114)$$

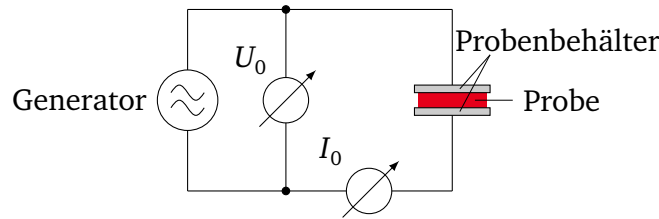


Bild 3.23: Schematischer Messaufbau in der dielektrischen Spektroskopie

angelegt, was zu einer Phasenverschiebung des gemessenen Stroms

$$I(\omega, t) = C(\omega) \frac{dU(\omega, t)}{dt} = i\omega C(\omega) U_0 e^{i\omega t} \quad (3.115)$$

führt. Die gemessene Impedanz beträgt damit

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} = \frac{1}{i\omega C(\omega)}. \quad (3.116)$$

Aus dem Zusammenhang $C(\omega) = \varepsilon(\omega) C_0$ ²⁰⁷ zwischen Kapazität C und dielektrischer Funktion ε ergibt sich

$$\varepsilon(\omega) = \frac{1}{i\omega C_0 Z(\omega)} \quad (3.117)$$

wobei C_0 zusätzliche Beiträge zur Kapazität durch die Probenzelle berücksichtigt. Aus der komplexen Permittivität lassen sich die dielektrische Dispersion ε' und der dielektrische Verlust ε'' aus

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) \quad (3.118)$$

gewinnen. Dispersion und Verlust enthalten die gleichen Informationen, da sie durch die Kramers-Kronig-Gleichungen nicht unabhängig voneinander sind.

Bild 3.24 zeigt schematisch die Frequenz- und Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Funktion für einen Debye-Relaxationprozess $\varepsilon(\omega) = 1/[1 + i\omega\tau]$ mit Korrelationszeit τ und einem zusätzlichem Beitrag durch Gleichstromleitfähigkeit. Die Frequenzabhängigkeit der Gleichstromleitfähigkeit durch freie Ladungsträger ist gegeben durch

$$\varepsilon(\omega) = i \frac{\sigma_{DC}}{\varepsilon_0 \omega} \quad (3.119)$$

und zeigt sich somit nur im dielektrischen Verlust. Der Debye-Prozess zeigt bei der charakteristischen Frequenz $\omega_p = 1/\tau$ im dielektrischen Verlust ein Maximum, in der Dispersion einen Abfall von $\varepsilon_\infty + \Delta\varepsilon$ auf ε_∞ . Sowohl Maximum als auch Abfall sind als Folge schnellerer Dynamik mit steigender Temperatur zu höheren Frequenzen

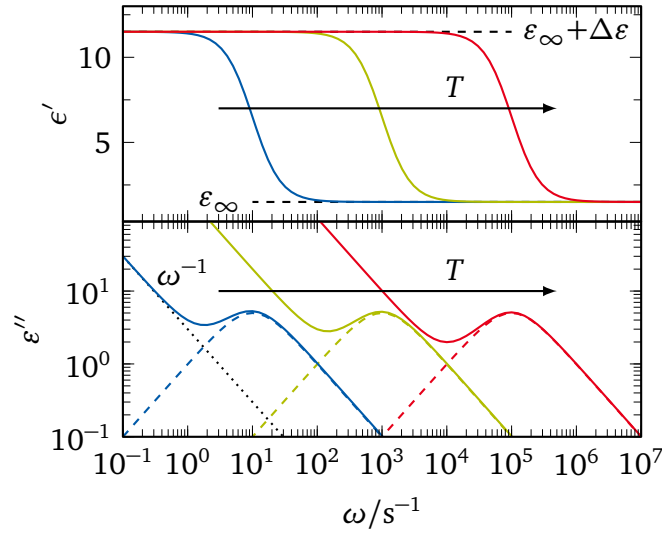


Bild 3.24: Dielektrische Dispersion ε' und dielektrischer Verlust ε'' eines Debye Prozesses und Beitrag der Gleichstromleitfähigkeit.

verschoben. Wie in Bild 3.24 angedeutet ist, wird eine genaue Bestimmung des Signalmaximums des Verlusts durch Signalbeiträge aufgrund der Überlagerung durch die Gleichstromleitfähigkeit erschwert. Aus der dielektrischen Dispersion $\varepsilon'(\omega)$ lässt sich aus der Ableitung $\partial \varepsilon'(\omega)/\partial \ln \omega$ als Näherung der Kramers-Kronig-Transformation ein dielektrischer Verlust

$$\varepsilon_d''(\omega) = -\frac{\pi}{2} \frac{\partial \varepsilon'(\omega)}{\partial \ln \omega} \approx \varepsilon''(\omega) \quad (3.120)$$

berechnen, der keinen Gleichstromleitfähigkeitsbeitrag besitzt.^{286,287} In dieser Form lassen sich Prozesse allgemein durch die Ableitung der Havriliak-Negami-Funktion²⁰⁷

$$\frac{\partial \varepsilon'_{\text{HN}}(\omega)}{\partial \ln \omega} = -\frac{\Delta \varepsilon \alpha \gamma (\omega \tau_{\text{HN}})^\alpha \cos \left[\frac{\alpha \pi}{2} - (1 + \gamma) \tan^{-1} \left(\frac{\sin(\alpha \pi/2)}{(\omega \tau)^\alpha + \cos(\alpha \pi/2)} \right) \right]}{\left[1 + 2(\omega \tau_{\text{HN}})^\alpha \cos \left(\frac{\alpha \pi}{2} \right) + (\omega \tau_{\text{HN}})^{2\alpha} \right]^{(1+\gamma)/2}} \quad (3.121)$$

anpassen. Der Nutzen der Betrachtung von ε_d'' ist in Bild 3.25 ersichtlich. Dort ist eine Überlagerung zweier Cole-Cole-Funktionen mit einem zusätzlichen Gleichstromleitfähigkeit abgebildet. Beim Vergleich von $\varepsilon''(\omega)$ und $\varepsilon_d''(\omega)$ fällt deutlich das Fehlen des Beitrags $\sim \omega^{-1}$ aufgrund der Gleichstromleitfähigkeit auf. Zusätzlich sind die beiden Relaxationsbeiträge deutlicher voneinander getrennt, da die Breite von $\varepsilon_d''(\omega)$ verringert ist, während die Maximumpositionen unverändert bleiben. Diese Darstellungsform bietet daher vor allem dann Vorteile, wenn eine starke Gleichstromleitfähigkeit auftritt oder breite, sich überlagernde Relaxationsprozesse vorhanden sind.

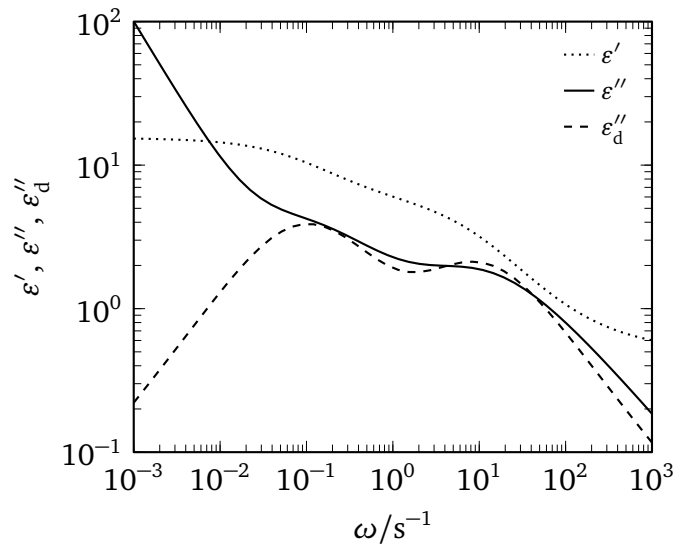


Bild 3.25: Vergleich von ε'' , ε' , ε''_d am Beispiel einer Summe von zwei Cole-Cole-Funktionen und Gleichstromleitfähigkeit.

Zum Umgang mit Elektrodenpolarisation existiert eine Vielzahl von Ansätzen, die sich in zwei Klassen einteilen lassen:^{288,289} Eine Klasse versucht durch Änderung des Aufbaus oder der Messdurchführung den Beitrag experimentell zu unterdrücken. Die andere Klasse versucht mithilfe eines passenden Modells die Elektrodenpolarisation in der Datenanpassung zu berücksichtigen. Experimentelle Ansätze waren bei der Untersuchung von Protein-Lösungsmittel-Mischungen bisher hauptsächlich zwei Methoden: Durch Anlegen einer ausreichend großen Spannung werden ioni-sche Beiträge vor der eigentlichen Messung immobilisiert, „Electrical Cleaning“ genannt,^{283,290,291} aber auch der Einbau einer zusätzlichen Teflonschicht innerhalb der Messzelle kam zum Einsatz.^{17,292} Während das Einbringen einer zusätzlichen Isolierungsschicht in der Literatur kritisiert wurde,^{293–295} ist auch der Einfluss des „Electrical Cleanings“ auf Proteinsysteme noch nicht endgültig geklärt worden.²⁸³ Auf die Möglichkeit der Modellierung von Elektrodenpolarisation wird in Abschnitt 7.2 genauer eingegangen.

3.7 Gegenüberstellung der Messmethoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und Protein liefern aufgrund ihrer Selektivität von Komponenten und aufgrund unterschiedlichen Längen- und Zeitskalen Informationen, die sich gegenseitig ergänzen und somit ein ganzheitlicheres Bild ergeben können.

Betrachtet man die Möglichkeiten, einzelne Komponenten hinsichtlich ihrer Dyna-

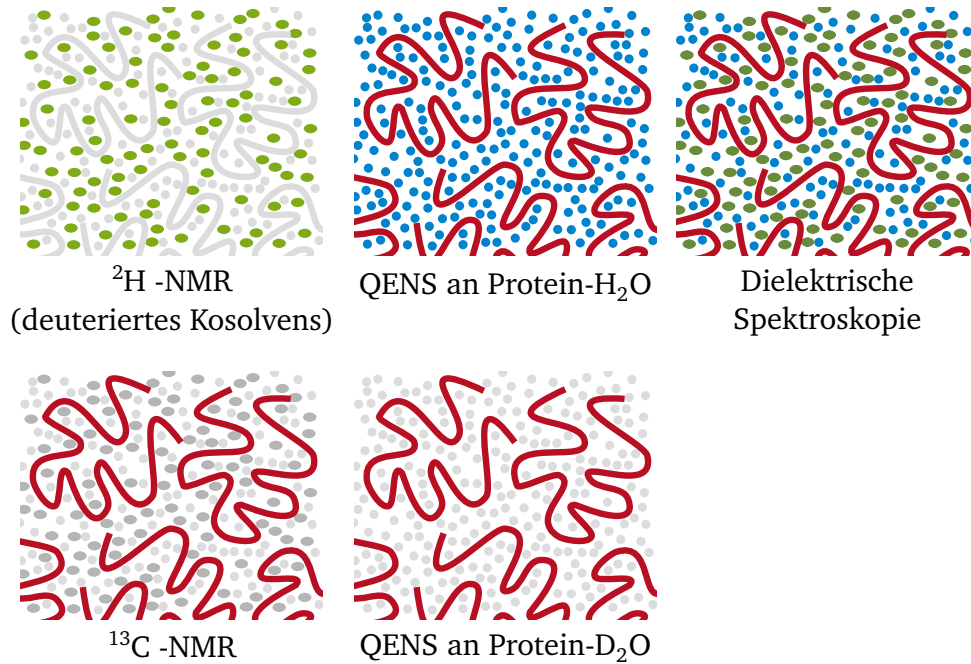


Bild 3.26: Selektivität der Methoden für Protein-Lösungsmittel-Mischungen (rot: Protein, blau: Wasser, grün: Kosolvens). Komponenten in grau werden von der entsprechenden experimentellen Methode wenig bis gar nicht detektiert.

mik isoliert zu untersuchen, sind dort besonders NMR und QENS hervorzuheben (Bild 3.26). Erstere bezieht ihre Selektivität aus dem isotopenspezifischen gyromagnetischen Verhältnis. So ist durch gezielte Isotopenmarkierung mit ^2H vor allem eine Untersuchung der Lösungsmittelkomponenten möglich, während in ^{13}C -NMR hauptsächlich die Proteindynamik getestet wird. Quasielastische Neutronenstreuung ist wegen seines großen Streuquerschnitts hauptsächlich auf das Wasserstoffisotop ^1H sensitiv. Durch den Einsatz von D_2O kann somit das Hydratwasser ausgeblendet werden, während bei Verwendung von H_2O sowohl Hydratwasser als auch Protein zu Streuereignissen beitragen. Die dielektrische Spektroskopie wiederum weist keine Selektivität in dieser Hinsicht auf und zeigt Beiträge aller Prozesse.

Bild 3.27 bietet einen Überblick über die experimentell zugänglichen Zeitskalen der verwendeten Messmethoden und einiger Einflüsse, die die Sensitivität dieser Methoden beeinflussen. Durch Kombination der in Abschnitt 3.2 beschriebenen NMR-Experimente ist es möglich, Dynamik auf Zeitskalen von 10^{-12} s bis in den Sekundenbereich zu untersuchen. Aufgrund der unterliegenden Wechselwirkungen beschränkt sich die hierbei beobachtete Dynamik allerdings auf Rotationsbewegungen. Die quasielastische Neutronenstreuung ist hingegen auf Dynamik im Piko- bis Nanosekundenbereich eingeschränkt, während durch Messungen bei verschiedenen

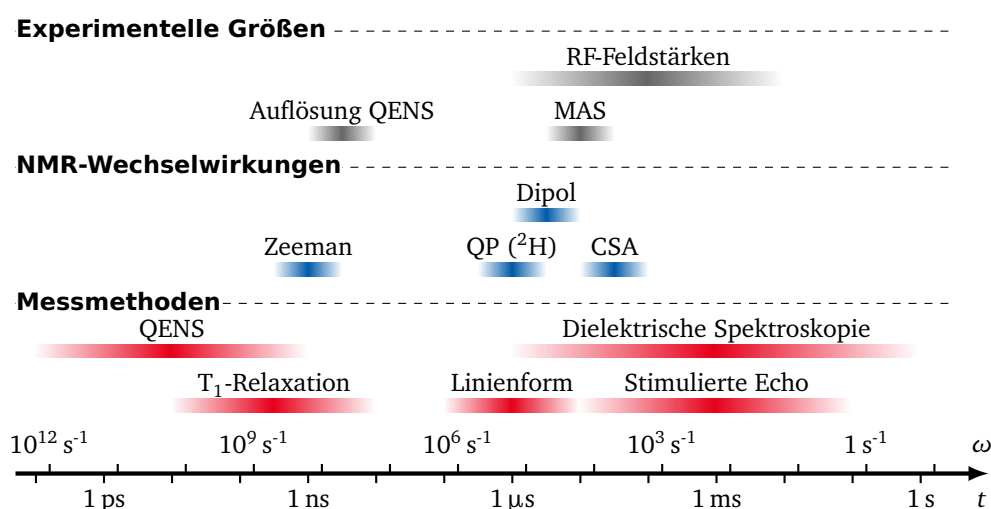


Bild 3.27: Übersicht über relevante Zeitskalen von Experimenten und NMR-Wechselwirkungen. Rot: Experimentelle Zeitskalen der verwendeten Experimente; blau: Größenordnungen von NMR-Wechselwirkungen (QP (^2H): Quadrupol-Wechselwirkung von ^2H -Verbindungen, CSA: Anisotrope chemische Verschiebung von ^{13}C -Verbindungen); grau: Bedingungen, die Einfluss auf Zeitskalen der entsprechenden Experimente haben (MAS: Magic Angle Spinning).

Streuvektoren q im Gegensatz zur NMR sowohl Rotations- als auch Translationsdynamik detektiert werden. Die Zeitskala der dielektrischen Spektroskopie wird in dieser Arbeit hauptsächlich durch den experimentellen Aufbau bestimmt. Dielektrik-Messungen sind genauso wie NMR-Experimente lediglich auf Rotationsdynamik sensitiv.

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben wurde, gibt es eine Vielzahl an Suszeptibilitätsmodellen zur Parametrisierung von Messdaten. Die Wahl der Suszeptibilität zur Beschreibung vorhandener Dynamik ist auch abhängig von der Wahl der Messmethode. In der dielektrischen Spektroskopie ist eine direkte Messung der Suszeptibilität möglich und die Parametrisierung hängt von der Passgenauigkeit der gewählten Modellfunktion an die Daten ab. Sowohl in der quasielastischen Neutronenstreuung als auch der NMR-Spektroskopie, wie sie in dieser Arbeit angewendet werden, wird die Suszeptibilität nur indirekt detektiert. Die gewonnenen Korrelationszeiten der mikroskopischen Dynamik aus den makroskopischen Observablen werden demnach stark von der Wahl der angenommenen Suszeptibilität beeinflusst. Bei NMR-Untersuchungen werden hier meist die Cole-Cole- oder Cole-Davidson-Funktion (Gleichung (3.18a) und Gleichung (3.18b)) verwendet, die eine temperaturunabhängige Breite der unterliegenden Verteilung von Korrelationszeiten mit einem einzigen Breitenparameter annehmen. In der Auswertung der quasielastischen Intensität

der Neutronenstreuexperimente, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wird, wird hingegen eine temperaturunabhängige Breite der Verteilung von Energiebarrieren als Ausgangspunkt genommen, was zu einer temperaturabhängigen Verteilung von Korrelationszeiten führt. Diese unterschiedlichen Ansätze müssen entsprechend bei der Diskussion von Korrelationszeiten im Vergleich unterschiedlicher Messmethoden berücksichtigt werden (siehe Abschnitt B.4).

4 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dynamik verschiedener Protein-Lösungsmittel-Systeme untersucht. Vor der Diskussion der Ergebnisse in den folgenden Kapiteln soll hier ein Überblick über die verwendeten Proteine und Lösungsmittel sowie über experimentelle Details der angewendeten Messmethoden gegeben werden.

4.1 Material

Elastin ist einer der Hauptbestandteile des Bindegewebes, dessen Elastizität hauptsächlich durch dieses Protein zustande kommt.²⁹⁶ Es ist mit 747 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ~ 64 kDa deutlich größer als andere Modellproteine. Elastin ist zu großen Teilen ungeordnet ohne definierte Sekundärstruktur,²⁹⁷ lässt sich aber in Lysin-reiche Bereiche, die der Vernetzung dienen, und in Bereiche mit einem hohen Anteil an Valin, Prolin und Glycin aufteilen.²⁹⁸ Die letztgenannten Bereiche gelten als Ursache der entropischen Elastizität.^{299–302} In Molekulardynamiksimulation und in einigen Experimenten werden statt Elastin elastinähnliche Polypeptide untersucht, die in der Lage sind, dessen Eigenschaften zu reproduzieren.^{121,303–306} Elastin

Lysozym (Lys) ist mit 147 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 16 kDa ein kleines globuläres Protein. 1922 von Alexander Fleming isoliert,³⁰⁷ fungiert es als Teil des Immunsystems.³⁰⁸ Als Modellprotein dient es in der Forschung zur Untersuchung von chemischen Reaktionen, Dynamik und Strukturen.³⁰⁹ Lysozym

Neben Größe und Struktur unterscheiden sich beide Proteine in ihren Glasübergangstemperaturen. Für Elastin werden abhängig vom Hydratationsgrad Glasübergangstemperaturen zwischen $T_g = 320$ K und $T_g \approx 470$ K gemessen³⁵ (Bild 4.1). Diese Werte liegen deutlich über den Glasübergangstemperaturen von Lysozym²⁸ zwischen 170 K und 240 K oder anderen globulären Proteinen wie Myoglobin¹²⁰ und BSA.¹¹⁹ Daraus folgt für diese Arbeit, dass sich Elastin im Gegensatz zu Lysozym in den untersuchten Temperaturbereichen im Glaszustand befindet.

In dieser Arbeit wurden die drei Lösungsmittel Wasser, Glycerin und Dimethylsulf-oxid (DMSO) verwendet, deren chemische Strukturen in Bild 4.2 zu sehen sind. Alle Lösungsmittel besitzen die Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mobilität und Funktionalität von Proteinen durch die Anwesenheit einer Hydrathülle ermöglicht wird.^{3,4} Sowohl Glycerin als auch DMSO sind aufgrund ihrer Verwendung als Kryokonservierungsmittel von biologischer Relevanz.^{31,33,34,310,311} Lösungsmittel

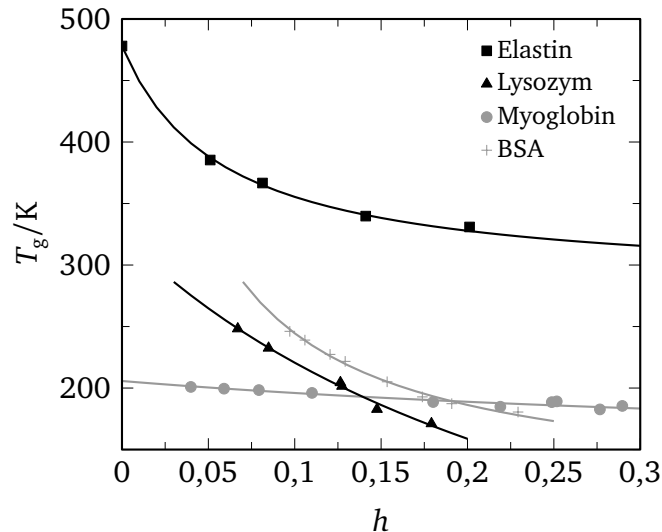


Bild 4.1: Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur T_g vom Hydratationsgrad für die Proteine Elastin,³⁵ Lysozym,²⁸ BSA¹¹⁹ und Myoglobin.¹²⁰ Die Linien dienen zur Orientierung.

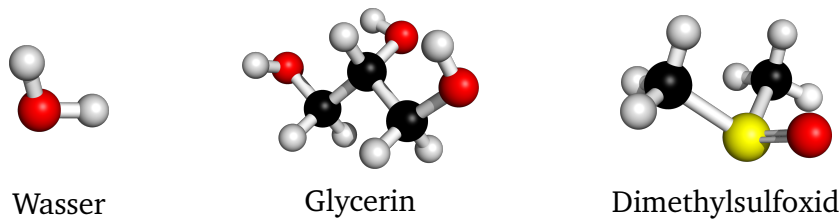


Bild 4.2: Chemische Strukturen der verwendeten Lösungsmittel (Schwarz: Kohlenstoff, weiß: Wasserstoff, rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel).

Wasser Wasser (H_2O , $M_{\text{mol}} = 18 \text{ g/mol}$) wurde in dieser Arbeit als alleiniges Lösungsmittel des Elastins sowie in binären Lösungsmitteln an Elastin und Lysozym untersucht. Es weist eine Reihe anomaler Eigenschaften auf, die bekannteste davon das Dichtemaximum bei 4°C .^{312–314} Versuche, die Eigenschaften zu erklären, haben in der Vergangenheit zu einer Vielzahl theoretischer Beschreibungen geführt.³¹⁵ Die experimentelle Untersuchung von Bulkwasser wird dadurch beeinträchtigt, dass zwischen 150 K und 230 K im sog. „no man’s land“ Kristallisation auftritt.^{313,316} Durch geometrische Einschränkungen lässt sich die Kristallisation jedoch unterdrücken und Wasser im unterkühlten Zustand untersuchen.³¹⁷

Glycerin Glycerin ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, $M_{\text{mol}} = 92 \text{ g/mol}$) wurde sowohl alleine als auch in Mischung mit Wasser als Lösungsmittel von Elastin verwendet. Die Dynamik des glasbildenden Systems ($T_g = 189 \text{ K}$ ⁹²) wurde im Bulksystem mit unterschiedlichen Methoden

untersucht.^{83,220,236,318,319} Der Vergleich von Glycerin und Wasser als Proteinsolvens zeigt, dass beide einen qualitativ ähnlichen Einfluss auf die Proteindynamik haben, Größen wie der dynamische Übergang (vgl. Bild 2.9) aber bei höheren Temperaturen beobachtet werden.^{138,162,320,321} Der Einfluss von Proteinen auf die Glycerindynamik ist nicht abschließend geklärt, da einige Untersuchungen eine Verlangsamung der Dynamik beobachteten,^{17,138,147} während andere keinen Einfluss ausmachen konnten.¹²⁷ Wasser-Glycerin-Mischungen sind in allen Verhältnissen mischbar und sind für Wasseranteile von $w < 68$ Gew.-% homogene glasbildende Systeme, bei höheren Wasseranteilen wird die Entstehung von Eisclustern beobachtet.^{322,323} Die Dynamik in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis wurde u. a. mittels dielektrischer Spektroskopie charakterisiert.^{324–327} Proteine in Wasser-Glycerin-Mischungen waren ebenfalls schon häufiger Gegenstand der Forschung. Oftmals wird der Einfluss auf die Stabilität des Proteins untersucht.^{202,328–330} Der Einfluss des Mischungsverhältnisses zeigt eine Verlangsamung der Proteindynamik mit steigendem Glycerinanteil, d. h. steigender Viskosität des Lösungsmittels.^{17,331–334}

Reines Dimethylsulfoxid (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, $M_{\text{mol}} = 78 \text{ g/mol}$) kristallisiert bei $T_m = 291 \text{ K}$. Es wurde in Wasser-DMSO-Mischungen als Lösungsmittel von Lysozym untersucht. Der eutektische Punkt dieser Mischungen liegt bei einem Wasseranteil von $x \approx 66 \text{ Mol-}\%$.³³⁵ Für Wasseranteile zwischen 10 Mol-% und 45 Mol-% ist zudem ein Glasübergang bei etwa 140 K zu beobachten. DMSO kann über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser oder hydrophilen Systemen interagieren, über die unpolaren Methylgruppen aber auch mit hydrophoben Bereichen von Proteinen wechselwirken. Bulk-mischungssysteme wurden bereits in Abhängigkeit von der Temperatur als auch vom Mischungsverhältnis untersucht.^{336–341} Dynamische und thermodynamische Größen von Wasser-DMSO-Mischungen hängen bereits im Bulksystem nichtlinear vom Mischungsverhältnis ab.^{335,341–343} Die Zugabe von Wasser-DMSO-Mischungen zu Proteinen ist ebenfalls von großem Interesse, da abhängig vom Mischungsverhältnis strukturelle Änderungen des Proteins induziert werden können.^{344–347} Insbesondere konnte gezeigt werden, dass sie bei Solvationsgraden $s \gg 1$ und einem Wasseranteil von weniger als $\sim 48 \text{ Mol-}\%$ zu einer Denaturierung von Lysozym führt.^{345–350}

4.2 Übersicht über die vermessenen Systeme

Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick darüber geben, welche Systeme in den angewendeten Messmethoden untersucht wurden. Alle Ausgangsmaterialien, die zur Präparation der Proben verwendet wurden, stammen von Sigma-Aldrich und wurden ohne weitere Reinigung benutzt. Vor der Mischung der Proben wurden die Proteine zusätzlich getrocknet, um mögliche Wasserrückstände zu entfernen.

Tabelle 4.1: Mischungsverhältnisse und Solvatationsgrad s der untersuchten binären Mischungen mit den in der Arbeit verwendeten Bezeichnungen. Solvatationsgrade mit * wurden sowohl in ^{13}C - als auch ^2H -NMR-Experimenten untersucht, mit $^\circ$ nur mit ^2H -NMR, ohne Kennzeichnung nur mit ^{13}C -NMR. Die Proben werden anhand des Gewichtsanteils des Glycerin bzw. Molanteil des Wassers spezifiziert.

Bezeichnung	Verhältnis Wasser : Kosolvens		Solv.grad s
	Mol	Masse	
Wasser-Glycerin			
94 Gew.-%	75 : 25	6 : 94	0,3
75 Gew.-%	37 : 63	25 : 75	*0,3, °0,6
50 Gew.-%	16 : 84	50 : 50	*0,3
25 Gew.-%	94 : 6	75 : 25	0,3
Wasser - DMSO			
33 Mol-%	33 : 67	68 : 32	*0,68
66 Mol-%	66 : 34	89 : 11	*0,97

NMR/
Dielektrische
Spektroskopie

Die gewünschte Zusammensetzung der Systeme, die mit dielektrischer Spektroskopie oder NMR-Experimenten untersucht wurden, wurden durch Abwiegen und Mischen der notwendigen Komponenten erreicht. Die präparierten Proben wurden vor den eigentlichen Messungen mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert, um eine gleichmäßige Verteilung des Lösungsmittels um das Protein zu gewährleisten.

Um den Einfluss des Lösungsmittelanteils auf das Protein zu charakterisieren, wurden Elastin-Glycerin-Systeme mit Lösungsmittelanteilen zwischen $s = 0,0$ (trockenes Elastin) und $s = 0,8$ (nicht mehr trockenes Elastin) untersucht.

^{13}C -NMR-Messungen an Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen wurden für Zusammensetzungen zusätzlich zu den Grenzfällen 100 : 0 (reines Wasser) und 0 : 100 (reines Glycerin) bei einem festen Solvatationsgrad von $s = 0,3$ für vier weitere Mischungsverhältnisse durchgeführt (Tabelle 4.1). Im Gegenzug fanden ^2H -NMR-Messungen an deuteriertem Glycerin (Glycerin-1,1,2,3,3- d_5) für die Massenverhältnisse 75 Gew.-% und 50 Gew.-% bei $s = 0,3$ und für 75 Gew.-% zusätzlich bei einem höheren Solvatationsgrad $s = 0,6$ statt. Die Wahl von Glycerin- d_5 ermöglichte es, ausschließlich dessen Dynamik zu verfolgen.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Systemen wurde bei den Wasser-DMSO-Mischungen an Lysozym anstelle des Solvatationsgrads die Gesamtteilchenzahl des Lösungsmittels festgehalten. Der Solvatationsgrad der Lysozym-Lösungsmittel-

Mischungen wurde so gewählt, dass auf eine Aminosäure etwa 1,8 Lösungsmittelmoleküle kommen. Dieses Verhältnis entspricht einem Hydratationsgrad von $h = 0,3$ des Lysozym-Wasser-Systems, sodass von einer vollständig ausgebildeten Lösungsmittelhülle um das Protein ausgegangen werden kann. Für die zwei gewählten Mischungsverhältnisse (Tabelle 4.1) stand die Untersuchung der Lösungsmitteldynamik im Vordergrund. Daher entstanden dielektrische Spektren für beide Protein-Mischungssysteme sowie ^2H -NMR-Messungen sowohl an deuteriertem Wasser (D_2O) als auch an deuteriertem DMSO ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$). Ergänzend wurden bei Raumtemperatur ^{13}C -NMR-Spektren der Lysozymsysteme angefertigt.

Mit quasielastischer Neutronenstreuung wurden drei Proben untersucht: Trockenes Elastin sowie mit H_2O bzw. D_2O hydratisiertes Elastin bei $h = 0,2$. Die Hydratation des Elastins zur Verwendung in Neutronenstreuexperimenten wurde durch Lagerung des trockenen Proteins in einer luftdicht abgeschlossenen Kammer* bei festgelegter Luftfeuchtigkeit erreicht. Um einen Hydratationsgrad von $h = 0,2$ zu erreichen, wurde die Luftfeuchtigkeit für das H_2O -System auf 85 % mittels einer gesättigten $\text{KCl-H}_2\text{O}$ -Lösung festgesetzt, für das D_2O -System auf 100 % mit reinem D_2O . Eine ausführliche Beschreibung der Hydratation unter gesättigter Wasseratmosphäre ist in der Arbeit von Kämpf⁴⁰ zu finden.

Neutronen-
streuung

4.3 Experimentelle Durchführung

^{13}C -CPMAS-Experimente wurden am TecMag Apollo Spektrometer mit zugehöriger Steuerung über das Windows XP-Programm NTNMR durchgeführt. Das äußere Magnetfeld betrug 8,4 T, was einer Larmorfrequenz von $2\pi \cdot 354,8 \text{ MHz}$ für ^1H und $2\pi \cdot 89,2 \text{ MHz}$ für ^{13}C entspricht. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine Rotorfrequenz von $\nu_{\text{rot}} = 6 \text{ kHz}$ verwendet. Die Kontaktzeit zur Kreuzpolarisation wurde so gewählt, dass die Signalintensität der Resonanzen im aliphatischen Bereich maximiert wird, und betrug 0,8 ms bis 1 ms. Die Entkopplung der ^1H - und ^{13}C -Spinbäder wurde durch Einstrahlung eines B_1 -Felds mit einer Stärke von etwa $2\pi \cdot 70 \text{ kHz}$ durchgeführt.

^{13}C -NMR

Kühlung auf die gewünschte Temperatur wurde über den Fluss von Stickstoffgas erreicht, der zugleich für die Drehung der Probe verantwortlich ist.³⁵¹ Die Proben-temperatur weicht beim verwendeten Doppelresonanzprobenkopf deutlich von der Anzeige- und Regeltemperatur des benutzten Thermoelements ab. Zur Kalibrierung der Temperatur über einen breiten Temperaturbereich kann die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Kernen wie ^{79}Br ,³⁵² ^{119}Sn ³⁵³ oder ^{209}Pb ausgenutzt werden.^{354,355} In dieser Arbeit wurde die chemische Verschiebung von $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ zur Kalibrierung verwendet.^{356,357} Unter MAS-Bedingungen wurde anhand

* Dafür bieten sich Exsikkatoren an, Einmachgläser erfüllen diesen Zweck aber auch.

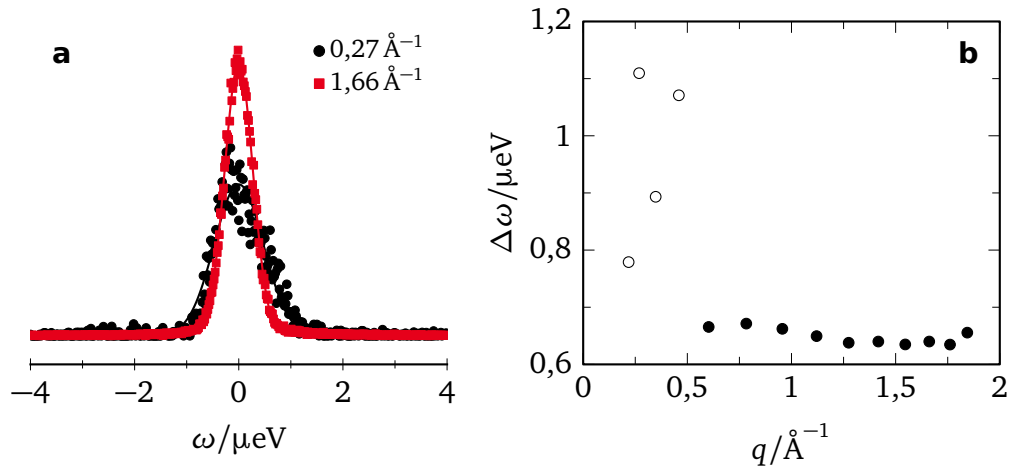


Bild 4.3: (a) Spektrum bei 5 K eines Kleinwinkeldetektors ($q = 0,27 \text{ \AA}^{-1}$) und eines Großwinkeldetektors ($q = 1,66 \text{ \AA}^{-1}$). (b) Halbwertsbreiten $\Delta\omega$ der Detektoren mit Unterscheidung zwischen Kleinwinkel- (offene Kreise) und Großwinkeldetektoren (gefüllte Kreise).

des Zusammenhangs zwischen Proben­temperatur und chemischer Verschiebung über³⁵⁷

$$T = -5,2 \cdot 10^{-4} \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{ppm}^2} \cdot (\delta - \delta(29^{\circ}\text{C}))^2 + 1,3 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{ppm}} \cdot (\delta - \delta(29^{\circ}\text{C})) + 30,1^{\circ}\text{C} \quad (4.1)$$

die tatsächliche Temperatur bestimmt.

²H-NMR ²H-NMR-Experimente wurden bei einem Magnetfeld von 7,1 T durchgeführt, was einer Larmorfrequenz von $\omega_L \approx 2\pi \cdot 46 \text{ MHz}^{\dagger}$ entspricht. Die Steuerung des Experiments erfolgte dabei über DAMARIS.³⁵⁸ Die Länge des 90°-Pulses betrug für alle Messungen etwa 2,0 μs bis 2,2 μs . Die untersuchten Temperaturen im Bereich von 100 K bis 300 K wurde über Stickstoffkryostate und Temperaturkontrollen der Firma Oxford geregelt.

Dielektrische Spektroskopie Dielektrische Spektren wurden im Frequenzbereich von 10^{-1} Hz bis 10^6 Hz an einem Novocontrol α -N High Resolution Analyzer durchgeführt. Die Messtemperaturen im Temperaturbereich von 140 K bis 300 K wurde mittels eines Novocontrol Quatro Kryosystems geregelt. Die Kondensatorplatten der verwendeten Messzelle³⁵⁹ hatten einen Durchmesser von 18 mm und einen Abstand von 4,09 mm. Als Anregungsspannung wurden 3 V an das System angelegt.

[†] Abhängig vom Magneten bei $2\pi \cdot 46,1 \text{ MHz}$ bzw. $2\pi \cdot 46,7 \text{ MHz}$. Der Unterschied in der Larmorfrequenz ist jedoch vernachlässigbar, weshalb keine Unterscheidung zwischen beiden Frequenzen gemacht wird.

Spektren aus quasielastischer Neutronenstreuung wurden am Rückstreuenspektrometer SPHERES³⁶⁰ am FRM-II über einen Temperaturbereich von 4 K bis 360 K aufgenommen. Sie stellen eine Erweiterung vorheriger QENS-Experimente von Kerstin Kämpf dar.⁴⁰ Die maximal zugängliche Energiebereich beträgt $\pm 30 \mu\text{eV}$, wurde in dieser Arbeit aber auf einen Bereich von $\pm 4,6 \mu\text{eV}$ eingeschränkt. Bei SPHERES lässt sich zwischen Kleinwinkeldetektoren für Streuvektoren im Bereich von $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ bis $0,5 \text{ \AA}^{-1}$ und Großwinkeldetektoren von $0,5 \text{ \AA}^{-1}$ bis $1,9 \text{ \AA}^{-1}$ unterscheiden. In Bild 4.3 sind Spektren bei $T = 5 \text{ K}$ für beide Detektorarten sowie die Halbwertsbreiten der einzelnen Detektoren zu sehen. Da die Probe bei dieser Temperatur keine Dynamik aufweist, ist die Linienform ausschließlich durch die Auflösung des Spektrometers bestimmt. Die Großwinkeldetektoren weisen die angegebene Halbwertsbreite von $0,64 \mu\text{eV}$ auf,³⁶⁰ was mit

$$\tau_{\text{res}} = 2\hbar\sqrt{\ln 2}\Delta\omega^{-1} \quad (4.2)$$

einer zeitlichen Auflösung von $1,71 \text{ ns}$ entspricht.²⁷⁴ Die Kleinwinkeldetektoren besitzen deutlich größere Halbwertsbreiten von etwa $1,71 \mu\text{eV}$. Aus diesem Grund sowie wegen der asymmetrischen Form der Spektren, wie in Bild 4.3 zu erkennen, wurden diese bei der Auswertung der Daten nicht berücksichtigt.

4.4 Auswertung

Die Auswertung aller Messdaten geschah mit einem Programm, das während dieser Arbeit geschrieben wurde. Einen Überblick über Funktionsumfang und weitere Details finden sich in Abschnitt A..

5 QENS: ELASTIN-WASSER

Quasielastische Neutronenstreuung wurde bereits erfolgreich zur Charakterisierung der Dynamik von Protein-Lösungsmittel-Systemen verwendet, insbesondere in der Diskussion um den dynamischen Übergang, der im mittleren Verschiebungsquadrat solcher Systeme beobachtet wird^{25,192,361} (vgl. Abschnitt 2.3). Diese Untersuchungen verwendeten meist globuläre Proteine mit niedrigen Glasübergangstemperaturen T_g (vgl. Bild 4.1). Hier soll der Frage nachgegangen werden, wie sich Hydratation auf ein nichtglobuläres Protein auswirkt, das deutlich unterhalb seiner Glasübergangstemperatur vorliegt. Die Dynamik des Hydratwassers und des Proteins wird dafür sowohl anhand des mittleren Verschiebungsquadrats als auch über die quasielastische Intensität charakterisiert.

Dieses Kapitel erweitert die Ergebnisse von Kerstin Kämpf, die in vorherigen Messungen hydratisiertes Elastin im Temperaturbereich $T = 4\text{ K} - 300\text{ K}$ mittels quasielastischer Neutronenstreuung untersuchte, jedoch keine eindeutigen Schlussfolgerungen daraus ziehen konnte. Durch Hinzunahme des trockenen Elastins sowie durch Erweiterung des Temperaturbereichs auf 360 K sollte zum einen der Einfluss der Hydratation auf die Dynamik deutlich werden, zum anderen sollten Effekte aufgrund des Glasübergangs des hydratisierten Proteins bei 320 K zu erkennen sein.

Korrelations-
zeiten

Für das Elastin-Wasser-System bei $h = 0,2$ sind bereits Korrelationszeiten aus NMR-Messungen¹⁶ und aus dielektrischer Spektroskopie^{27,362} bekannt, die in Bild 5.1 aufgetragen sind. Der schnellste Prozess I, beobachtbar in dielektrischer und NMR-Spektroskopie, lässt sich der Reorientierung des Hydratwassers zuordnen und wird auch in anderen Protein-Wasser-Systemen beobachtet.^{16,200} Prozess II wird von Samouillan et al. auf lokale Bewegung des Wasser-Elastin-Systems zurückgeführt. In anderen Untersuchungen mittels dielektrischer Spektroskopie werden für vergleichbare Prozesse die lokale Reorientierung mobiler Proteinbereiche (z. B. Seitengruppen) als Ursache angeführt.^{17,155} Der langsamste Prozess III wird in beiden Untersuchungen, in denen er beobachtet wird, als kooperativer Prozess bezeichnet.^{27,362} Anhand der Abbildung lassen sich bereits zwei mögliche Temperaturbereiche ausmachen, in denen ein dynamischer Übergang denkbar ist: Bei $T \approx 320\text{ K}$ am Glasübergang, wie er in verschiedenen Untersuchungen postuliert wird,^{26,192} und bei etwa 230 K , wenn der beobachtete Wasserprozess das dynamische Fenster des Spektrometers durchläuft.^{18,26}

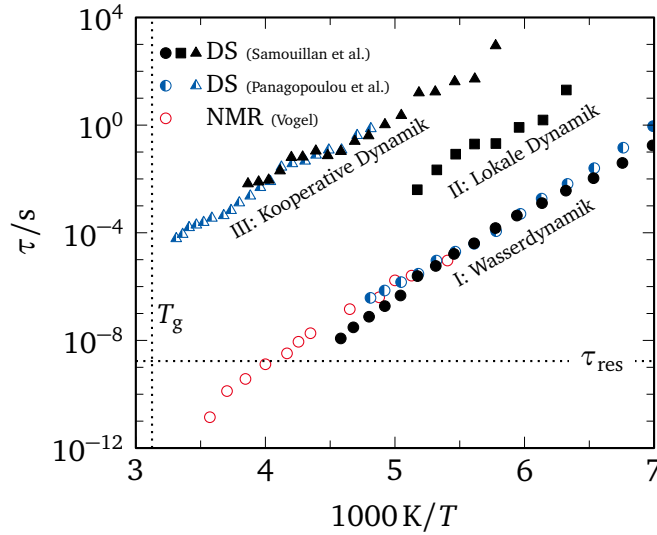


Bild 5.1: Korrelationszeiten aus der Literatur für Elastin-Wasser-Systeme bei $h = 0,2$. Daten in rot sind Ergebnisse aus ^2H -NMR,¹⁶ in blau und schwarz aus dielektrischer Spektroskopie.^{27,362} Horizontale Linie kennzeichnet die Auflösung von SPHERES, die vertikale Linie die Glasübergangstemperatur des hydratisierten Elastins.³⁵

5.1 Mittleres Verschiebungsquadrat

Zur Beschreibung des Protein-Wasser-Systems wird aus dem elastischen Beitrag der gemessenen Spektren das mittlere Verschiebungsquadrat gewonnen. Bild 5.2 zeigt beispielhaft die Abhängigkeit des auf 4 K normierten Strukturfaktors des Elastin- H_2O -Systems vom Streuvektor für verschiedene Temperaturen. Unter der Annahme, dass die gaußsche Näherung gültig ist, lässt sich das mittlere Verschiebungsquadrat bei Auftragung des logarithmierten Strukturfaktors über q^2 aus der Geradensteigung (Gleichung (3.101)) ablesen. Wie zu sehen ist, nimmt mit steigender Temperatur die Abweichung vom linearen Verhalten zu und eine Berücksichtigung eines Korrekturterms wie in Gleichung (3.102) führt zu einer besseren Beschreibung der Messdaten. Als Gründe für Abweichungen von der harmonischen Näherungen werden in der Literatur Beiträge von Mehrfachstreuung,³⁶³ Verteilungen von mittleren Verschiebungsquadraten¹⁷⁶ oder Diffusion auf der experimentellen Zeitskala τ_{res} ³⁶³ genannt.

Bild 5.3 zeigt das mittlere Verschiebungsquadrat der drei untersuchten Proben sowohl unter der Annahme der gaußschen Näherung nach Gleichung (3.100) in Bild 5.4a als auch mit Korrekturterm nach Gleichung (3.102) in Bild 5.4b. Das mittlere Verschiebungsquadrat unter Berücksichtigung nichtgaußscher Beiträge ist für alle Proben über den gesamten untersuchten Temperaturbereich höher, was bereits

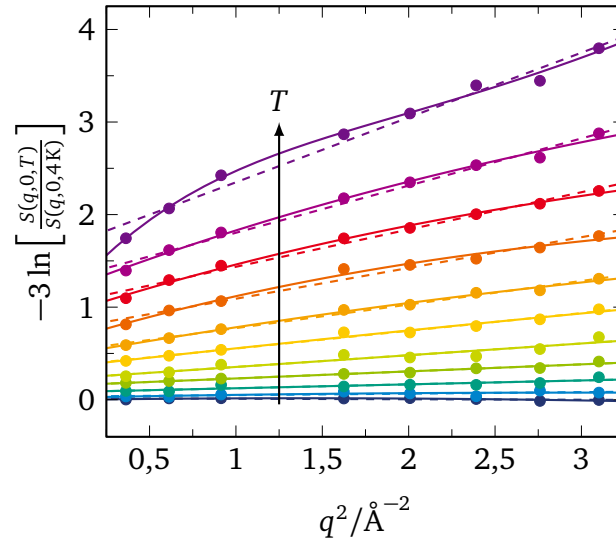


Bild 5.2: Anpassung des mittleren Verschiebungsquadrats für ausgewählte Temperaturen: Gestrichelte Linien sind Anpassungen nach Gleichung (3.100) mit gaußscher Näherung, durchgezogene Linien nach Gleichung (3.102) unter Berücksichtigung nichtgaußscher Beiträge.

in der Literatur beschrieben wurde.³⁶³ Qualitativ zeigen die mittleren Verschiebungsquadrate aus beiden Auswertungen jedoch ähnliche Temperaturabhängigkeiten. Unterhalb von etwa 120 K steigt das mittlere Verschiebungsquadrat durch Vibrationsbeiträge um die Ruhelage der Atome linear mit der Temperatur. Ein solcher linearer Anstieg ist für harmonische Potentiale zu erwarten. In allen Proben ist bei etwa 120 K eine Änderung der Temperaturabhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats sichtbar, was auf das Einsetzen anharmonischer Beiträge der Methylgruppenrotation zurückzuführen ist.^{361,364,365} Ab diesem Temperaturbereich dominiert dieser Beitrag das mittlere Verschiebungsquadrat des trockenen Elastins und zunächst auch der hydratisierten Systeme. Anzeichen einer weiteren Steigungsänderung, wie sie in einem getrockneten perdeuterierten Protein gefunden wurde und als Zeichen intrinsischer Heterogenität der Energielandschaft interpretiert wurde,¹⁷³ sind hier für das trockene Elastin nicht zu beobachten.

Bei einem Vergleich des trockenen und des hydratisierten Elastins fällt auf, dass unterhalb von etwa 175 K kein Einfluss der Hydratation auf das mittlere Verschiebungsquadrat zu erkennen ist. Bei Überschreiten dieser Temperatur weist das mittlere Verschiebungsquadrat der beiden hydratisierten Proben eine stärkere Temperaturabhängigkeit im Vergleich zu dem des trockenen Elastins auf. Auch die Varianz σ^2 beginnt in diesem Bereich, eine stärkere Temperaturabhängigkeit zu zeigen. Die beobachteten Effekte sind weitgehend unabhängig vom Wasserstoffisotop des Hydratwassers. Anders als für das mittlere Verschiebungsquadrat kann für die Varianz

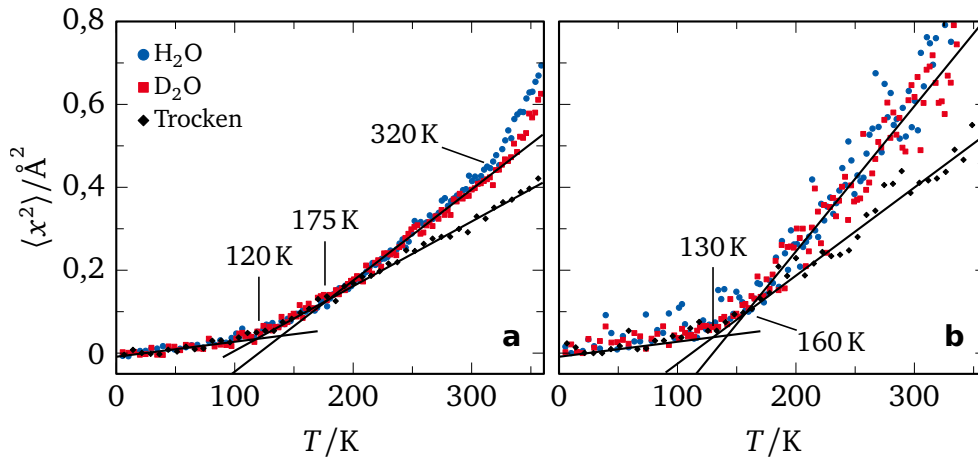


Bild 5.3: Mittleres Verschiebungsquadrat von trockenem Elastin und hydratisiert mit D_2O bzw. H_2O (a) bei gaußscher Näherung und (b) unter Berücksichtigung nichtgaußscher Beiträge. Linien dienen zur Verdeutlichung der Temperaturabhängigkeiten, die angegebenen Temperaturen zeigen Schnittpunkte der Geraden an. Zur besseren Vergleichbarkeit werden nur Daten für $\langle x^2 \rangle < 0,8 \text{ \AA}^2$ gezeigt (siehe Bild 5.4).

des trockenen Proteins ab $T \approx 200 \text{ K}$ eine schwache Zunahme mit steigender Temperatur beobachtet werden. Während die hydratisierten Proben eine kontinuierliche Steigerung der Varianz aufweisen, scheint sie im trockenen Elastin bei $\sigma^2 \approx 0,8 \text{ \AA}^2$ zu sättigen. Das signifikante Rauschen verhindert jedoch diesbezüglich eindeutige Aussagen.

Unterschiede zwischen der Hydratation durch H_2O und D_2O werden oberhalb von 320 K sichtbar. Betrachtet man das mittlere Verschiebungsquadrat mit gaußscher Näherung, ändert sich die Temperaturabhängigkeit des Elastin- H_2O -Systems bei $T = 320 \text{ K}$, die des Elastin- D_2O -Systems bei etwa $T = 325 \text{ K}$. In beiden Fällen ist die Steigung des mittleren Verschiebungsquadrats jedoch vergleichbar. Für das mittlere Verschiebungsquadrat mit nichtgaußscher Korrektur ist aufgrund der größeren Streuung der Daten kein Temperaturunterschied zwischen der D_2O - und der H_2O -Probe zu erkennen, aber auch hier sind Änderungen der Temperaturabhängigkeit oberhalb von 320 K bis 325 K zu beobachten. Während Elastin- D_2O nur eine schwache Änderung der Steigung aufweist, steigt das mittlere Verschiebungsquadrat und die Varianz des Elastin- H_2O -Systems sprunghaft um den Faktor 2 (Bild 5.4). Dieser deutliche Unterschied zwischen den hydratisierten Proben wird durch Dynamik des Hydratwassers verursacht, dessen Bewegung hauptsächlich in der H_2O -Probe sichtbar ist.

Der Übergang des mittleren Verschiebungsquadrats im Hochtemperaturbereich für

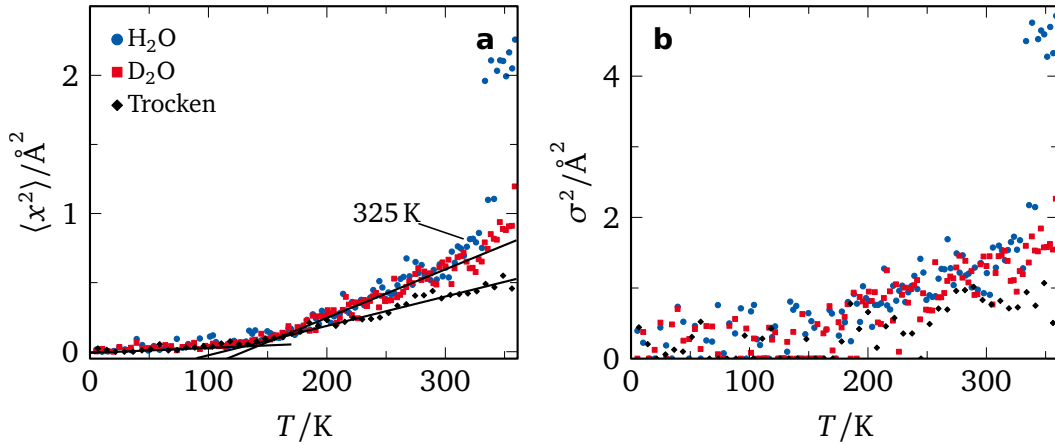


Bild 5.4: (a) Mittleres Verschiebungsquadrat und (b) Varianz von trockenem Elastin sowie hydratisiert mit D₂O bzw. H₂O bei Berücksichtigung nichtgaußscher Effekte (Gleichung (3.102)).

die hydratisierten Proben fällt für das Elastin-H₂O-System mit dem Überschreiten der entsprechenden Glasübergangstemperatur T_g zusammen. Dieses starke Ansteigen des mittleren Verschiebungsquadrats bei T_g ist ein Phänomen, das generell für glasbildende Systeme in der Neutronenstreuung beobachtet wird.^{51,318,366,367} Der Versatz der Temperaturänderung für Elastin-D₂O um ca. 5 K kann dadurch erklärt werden, dass die Glasübergangstemperatur beider Systeme aufgrund eines Isotopeneffekts unterschiedlich ist. Die Temperaturverschiebung der Dynamik aufgrund eines Isotopeneffekts wurde auch für Wasser in Bulk, Confinement und in amorphen Eisphasen gefunden.³⁶⁸

Die Steigungsänderung bei $T_d \approx 175 \text{ K} - 200 \text{ K}$ erscheint zunächst wie ein dynamischer Übergang, wie er auch im mittleren Verschiebungsquadrat anderer Protein-Lösungsmittel-Systeme gefunden wird.^{101,120,141} Die Beobachtung, dass dieser Übergang unterhalb der Glasübergangstemperatur auftritt, unterscheidet das Elastin-Wasser-System jedoch von anderen Protein-Lösungsmittel-Systemen, für die entweder nur ein Übergang beobachtet wird^{120,154} oder der dynamische Übergang oberhalb des Glasübergangs gefunden wird.^{26,192} Eine Änderung des mittleren Verschiebungsquadrats unterhalb von T_g wurde hingegen auch für Trehalose³⁶⁹ und Sucrose³⁷⁰ berichtet. Diese beiden Beispiele und die bereits erwähnten Übergänge in trockenen Proteinen¹⁷³ wurden von Ngai et al. auf den Glasübergang eines JG- β -Prozesses bei $T_{g\beta}$ zurückgeführt.^{25,174} Prozesse I und II aus Bild 5.1 sind auf einer Zeitskala von 10^{-4} s bis 10^{-2} s und sind daher nicht aktiv am Übergang beteiligt. Der langsamste Prozess III erreicht hingegen im Temperaturbereich des beobachteten Übergangs die Zeitskala von 1000 s und könnte möglicherweise ähnliche Effekte wie ein Glasübergang auslösen. Eine ausführlichere Diskussion der Interpretation dieses Übergangs,

auch vor dem Hintergrund der Modelle zur Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung, folgt am Ende des Kapitels.

5.2 Quasielastische Intensität

Um Einblicke in die Dynamik des Hydratwassers zu erlangen, wurde die quasielastische Intensität bei einem mittleren Energieoffset von $\omega_{\text{off}} = 2,25 \mu\text{eV}$ für alle Proben ausgewertet (vgl. Abschnitt 4.3). Durch die Wahl dieser Energie ist die Auswertemethode auf dynamische Prozesse sensitiv, die auf einer Zeitskala von $\tau \approx 0,29 \text{ ns}$ stattfinden. Die Untersuchung der quasielastischen Intensität bei einem festen Energieoffset, wurde für verschiedene Systeme zur Beschreibung dynamischer Prozesse eingesetzt.^{280,371,372}

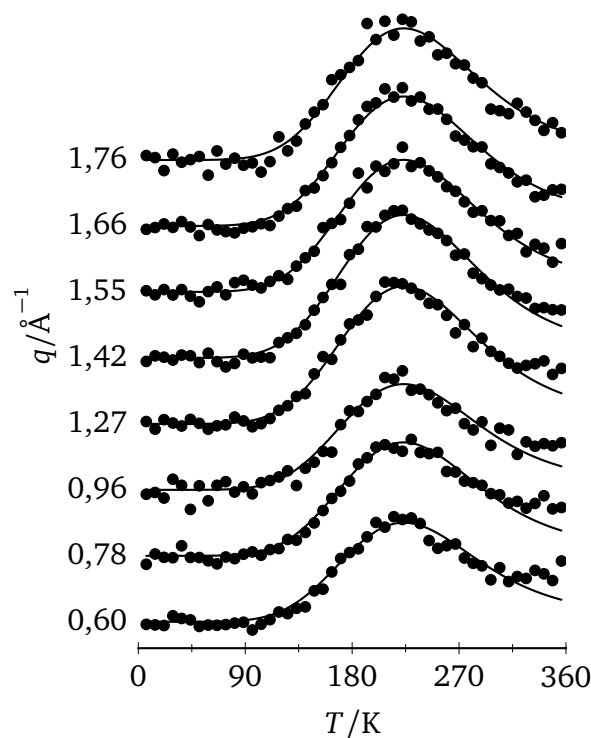


Bild 5.5: Temperaturabhängigkeit der quasielastischen Intensität bei $\omega_{\text{off}} = 2,25 \mu\text{eV}$ des trockenen Elastins für verschiedene q -Werte. Zur besseren Darstellung sind die Intensitäten in vertikaler Richtung gegeneinander verschoben. Durchgezogene Linien sind Anpassungen nach Gleichung (5.4).

Die gefundene Temperaturabhängigkeit von $S(q, 2,25 \mu\text{eV})$ des trockenen Elastins für die untersuchten Streuvektoren ist in Bild 5.5 zu sehen. Für die verschiedenen Streuvektoren ergibt sich zwischen 4 K und 300 K kein Unterschied in der Temperaturabhängigkeit, darüber zeigt sich ein zusätzlicher Beitrag, der mit sinkendem

Trockenes
Elastin

Streuvektor an Intensität gewinnt. An dieser Stelle wird zunächst davon abgesehen, ohne weitere Informationen mögliche Ursachen für den zweiten Beitrag zu benennen. Bei einer Temperatur von $T = 120$ K tritt ein dynamischer Prozess in das experimentelle Zeitfenster und führt zu einem Anstieg der Intensität, der bei etwa 200 K sein Maximum erreicht. Bei der höchsten gemessenen Temperatur von 360 K ist die Intensität fast vollständig wieder abgefallen, was darauf schließen lässt, dass das experimentelle Zeitfenster zwischen 120 K und 360 K fast vollständig durchquert wird. Wie auch schon beim mittleren Verschiebungsquadrat des trockenen Elastins kann dieser Prozess der Methylgruppenrotation des Proteins zugeordnet werden.¹⁴² Die fehlende Abhängigkeit der Intensitäten vom Streuvektor q weist auf einen lokalen Prozess hin²⁰⁸ und unterstützt die Zuordnung zur Reorientierung der Methylgruppen.

Methylgruppen-
dynamik

Die Dynamik von Methylgruppen lässt sich durch einen Dreiplatzsprung um deren Symmetrieachse beschreiben, dessen Temperaturabhängigkeit einem Arrhenius-Gesetz

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{E}{k_B T}\right) \quad (5.1)$$

folgt.³⁷³ In Proteinen befinden sich die Methylgruppen in unterschiedlichen Umgebungen mit entsprechend verschiedenen Energiebarrieren E , sodass zur Beschreibung eine Gaußverteilung von Energiebarrieren

$$G(E) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{-\left(\frac{E - E_m}{\sqrt{2}\sigma}\right)^2\right\} \quad (5.2)$$

mit mittlerer Energie E_m und Verteilungsbreite σ zur Parametrisierung genutzt werden kann.^{101,141–143} Wie aus Abschnitt 3.5 bekannt ist, kann die quasielastische Intensität bei gegebenem Energieoffset ω_{off} im Fall einer einzigen Korrelationszeit durch

$$S_{\text{qe}}(q, \omega_{\text{off}}) = A(q) \frac{\tau}{1 + \omega_{\text{off}}^2 \tau^2} \quad (5.3)$$

beschrieben werden. Berücksichtigt man die Verteilung aus Gleichung (5.2) und die Temperaturabhängigkeit aus Gleichung (5.1), erweitert sich die Gleichung zu

$$S(q, T) = A(q) \int_0^\infty G(E) \frac{\tau(E, T)}{1 + \omega_{\text{off}}^2 \tau(E, T)^2} dE \quad (5.4)$$

mit den vom Streuvektor q unabhängigen Parametern τ_0 , E_m und σ und den q -abhängigen Vorfaktoren $A(q)$. Da die Parameter τ_0 , E_m und σ nicht unabhängig voneinander sind,²⁸¹ wird τ_0 in Übereinstimmung mit der Literatur^{101,141,280} auf den Wert 10^{-13} s festgesetzt. Die Anpassung der Daten mit Gleichung (5.4) ist in Bild 5.5 zu sehen. Sie beschreibt den Kurvenverlauf für alle Streuvektoren sehr gut. Der

resultierende Wert für die mittlere Aktivierungsenergie ist $E_m = 0,17 \text{ eV}$, für die Verteilungsbreite $\sigma = 0,04 \text{ eV}$. Diese Verteilung von Energiebarrieren entspricht sehr gut den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen.^{141,142,361}

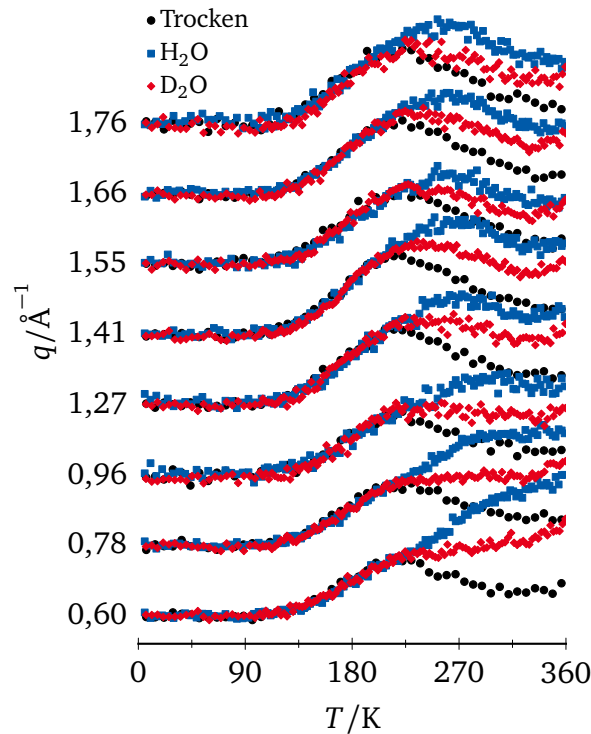


Bild 5.6: Temperaturabhängigkeit der quasielastischen Intensität bei $\omega_{\text{off}} = 2,25 \text{ } \mu\text{eV}$ von trockenem Elastin und der hydratisierten Systeme Elastin- H_2O und Elastin- D_2O .

Nachdem die Dynamik des trockenen Elastins durch die Betrachtung der quasielastischen Intensität gut beschrieben werden konnte, kann dies als Ausgangspunkt zum Vergleich mit den hydratisierten Systemen dienen. Die Temperaturabhängigkeit für die verschiedenen Systeme ist in Bild 5.6 dargestellt. Im Tieftemperaturbereich bis 200 K ist kein Einfluss der Hydratation auf die Intensität zu beobachten. Dies bedeutet, dass Prozesse, die durch Hydratation ermöglicht werden, noch nicht im gewählten Zeitfenster des Experiments sind. Bei Überschreiten von 200 K erhöht sich die Intensität beider hydratisierten Proben im Vergleich mit der trockenen Probe. Die Intensität des Elastin- H_2O -Systems ist dabei höher als die des entsprechenden Elastin- D_2O -Systems, was auf Beiträge der Wasserdynamik zurückzuführen ist. Für hohe Streuvektoren besonders deutlich zu erkennen ist ein zusätzlicher Anstieg für $T > 300 \text{ K}$.

Hydratisierte
Systeme

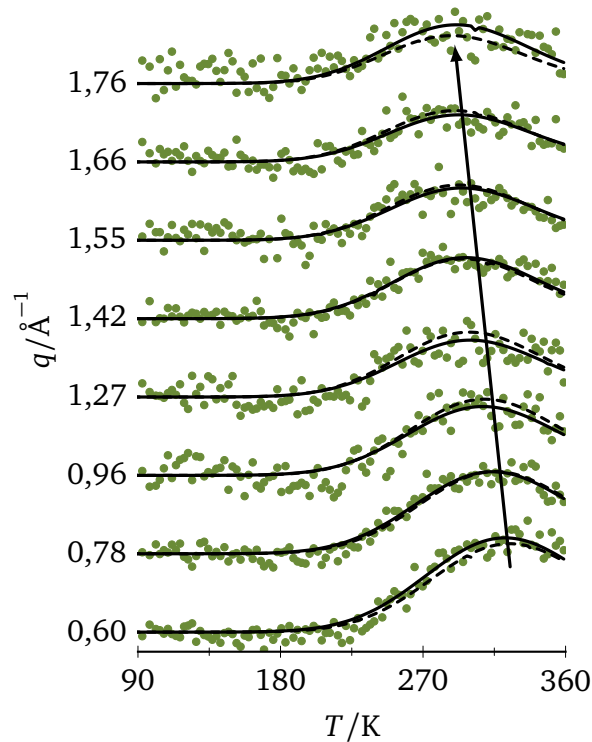


Bild 5.7: Temperaturabhängigkeit des Beitrags der Wasserdynamik zur quasielastischen Intensität. Der Pfeil weist auf die q -Abhängigkeit des Signalmaximums hin. Durchgezogene Linien sind Anpassungen von Gleichung (5.7) mit freier Amplitude $A(q)$, gestrichelte Linien von Gleichung (5.7) mit gemeinsamer Amplitude $A(T)$ nach Gleichung (5.10).

Wasserdynamik

Sowohl aus NMR-Untersuchungen als auch aus Neutronstreuexperimenten ist bekannt, dass die Methylgruppendifynamik unbeeinflusst von der Hydratation des Proteins bleibt.^{101,145} Zudem weist das mittlere Verschiebungsquadrat in Bild 5.3 darauf hin, dass die beobachtete Dynamik, die durch das Protein hervorgerufen wird, unabhängig von der Isotopenzusammensetzung des Hydratwassers ist. Die Wasserdynamik lässt sich unter diesen Voraussetzungen isolieren, indem die quasielastische Intensität des Elastin-D₂O-Systems von der der Elastin-H₂O-Systems subtrahiert wird. Die Subtraktion beider Datensätze voneinander führt zu den in Bild 5.7 gezeigten Kurven. Anders als für die Methylgruppendifynamik ist hier eine deutliche Abhängigkeit der Intensität nicht nur von der Temperatur, sondern auch vom Streuvektor zu erkennen. Das Intensitätsmaximum verschiebt sich von $T_{\max} \approx 320$ K für den kleinsten Streuvektor $q = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$ hin zu $T_{\max} \approx 275$ K für den größten Streuvektor $q = 1,76 \text{ \AA}^{-1}$. Die Abhängigkeit der Intensität vom Streuvektor ist ein Anzeichen diffusiver Bewegung.^{208,281} Die Existenz von Translationsbewegung des Hydratwassers wurde auch in anderen Untersuchungen festgestellt und als

notwendige Voraussetzung von Proteinfluktuationen interpretiert.^{175,374} Wie auch in vorherigen Messungen von Kämpf nimmt die Gesamtintensität mit größer werdendem Streuvektor ab, eine Begründung für diesen Befund konnte dort allerdings nicht gegeben werden.⁴⁰ Zur Modellierung der Daten wird erneut Gleichung (5.4) angewendet, da auch die Dynamik von Wasser an Polymer- und Proteinoberflächen mithilfe einer Verteilung von Aktivierungsenergien beschrieben werden kann.^{37,375} Um die Streuvektorabhängigkeit der diffusiven Bewegung des Wassers ausreichend zu berücksichtigen, wird hier vom Fall freier Diffusion

$$q^{-2} \propto D\tau \quad (5.5)$$

ausgegangen. Die Annahme der Kopplung zwischen Korrelationszeit τ und Sprungrate D ist auf den von den betrachteten Streuvektoren abgedeckten Längenskalen gerechtfertigt. Die Korrelationszeit $\tau(E, T)$ wird nun durch

$$\tau(E, T, q) = q^{-2} D^{-1}(E, T) = \frac{1}{q^2 D_0} \exp\left(\frac{E}{k_B T}\right) \quad (5.6)$$

ausgedrückt. Entsprechend geschieht die Anpassung der Daten über

$$S(q, T) = A(q) \int_0^\infty G(E) \frac{q^2 D(E, T)}{(q^2 D(E, T))^2 + \omega_{\text{off}}^2} dE. \quad (5.7)$$

Wie auch bei der Anpassung des trockenen Elastins sind die Parameter E_m , σ und D_0 unabhängig vom Streuvektor q . Die Abhängigkeit der Intensitätshöhe vom Streuvektor kann für jeden Streuvektor durch einen Parameter $A(q)$ beschrieben werden. Eine weitere Möglichkeit, dieser Abhängigkeit Rechnung zu tragen, die in der Auswertung von Kämpf außer Acht gelassen wurde, ist die Berücksichtigung des Lamb-Mößbauer-Faktors

$$\text{LMF}(q) = \exp\left(-\frac{1}{3} q^2 \langle x^2 \rangle\right) \quad (5.8)$$

Die Temperaturabhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats lässt sich als

$$\langle x^2(T) \rangle = \langle x_0^2 \rangle + \frac{d\langle x^2 \rangle}{dT} T \quad (5.9)$$

ausdrücken,³⁷⁶ sodass anstelle individueller Parameter $A(q)$ der Vorfaktor durch

$$A(T) = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{1}{3} q^2 \frac{d\langle x^2 \rangle}{dT}\right) \quad (5.10)$$

mit den beiden globalen Parametern A_0 und $\frac{d\langle x^2 \rangle}{dT}$ beschrieben werden kann. In

Bild 5.7 sind beide Anpassungsvarianten zu sehen.

Tabelle 5.1: Fitparameter bei Anpassung der Hydratwasserdynamik nach Gleichung (5.7) unter Berücksichtigung des Lamb-Mößbauer-Faktors $A(T)$ und bei streuvektorabhängigem Vorfaktor $A(q)$.

Anpassung	E_m/eV	σ/eV	$D_0/\text{m}^2\text{s}^{-1}$
mit $A(T)$	0,57	0,08	0,06
mit $A(q)$	0,55	0,07	0,03

Unabhängig von der Parametrisierung des Vorfaktor beträgt die bestimmte mittlere Aktivierungsenergie $E_m = 0,55\text{ eV} - 0,57\text{ eV}$, die Verteilungsbreite ist $\sigma = 0,07\text{ eV} - 0,08\text{ eV}$. Da hier im Gegensatz zur Parametrisierung der Methylgruppenrotation der Vorfaktor $D_0 = 0,06\text{ m}^2/\text{s}$ nicht a priori festgelegt war, sind die bestimmten Größen stärker fehlerbehaftet als die entsprechende Verteilung der Methylgruppen. Dennoch stimmt diese Verteilung, insbesondere die mittlere Aktivierungsenergie, hervorragend mit dem Ergebnis von NMR- und Dielektrikuntersuchungen an hydratisiertem Elastin überein,^{16,37} wie auch anhand des Vergleichs in Bild 5.8 zu erkennen ist. Eine Aktivierungsenergie von 0,5 eV bis 0,6 eV wird für eine Vielzahl von Wassersystemen bei tiefen Temperaturen gefunden, u. a. in hartem Confinement,^{240,377} in Wasser-Polymer-Mischungen^{375,378} und Wasser-Protein-Systemen.^{17,37,200} Es existieren jedoch NMR- und Neutronenstreuuntersuchungen, die für das Hydratwasser einen Übergang bei 225 K von einem Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten zu einem Arrhenius-Verhalten postulieren.^{194,379} Die aus dem Elastin-Wasser-System gewonnenen Ergebnisse können eine solche Änderung der Temperaturabhängigkeit jedoch nicht bestätigen.

Die von Lusceac et al. gefundenen Verteilungsbreite beträgt $\sigma = 0,04\text{ eV}$ ³⁷ und ist somit um einen Faktor Zwei geringer als der hier gefundene Wert. Diese Verteilungsbreite wurde für ein Elastin-Wasser-System mit einem höheren Hydratationsgrad von $h = 0,43$ bestimmt. Gegen einen Einfluss des Hydratationsgrads auf die Verteilungsbreite sprechen hingegen Spin-Gitter-Relaxationsmessungen, die unabhängig davon sind.¹⁶ Der Unterschied kann allerdings davon herrühren, dass die in der Literatur und hier verwendeten Messmethoden unterschiedliche Arten der Dynamik beobachten. Die NMR- und Dielektrik-Messungen von Lusceac et al. beobachten ausschließlich Rotationsdynamik, die Neutronenstreuexperimente dieser Arbeit sind sensitiv auf Rotation- und Translationsdynamik, was möglicherweise in unterschiedlichen Verteilungen resultiert.

Anpassung der
Daten

Mit den bisher erreichten Ergebnissen, deren Temperaturabhängigkeiten in Bild 5.8 gezeigt sind, kann nun versucht werden, die quasielastische Intensität nachzubilden. Hierbei stellt sich heraus, dass dazu drei Prozesse benötigt werden, wie für

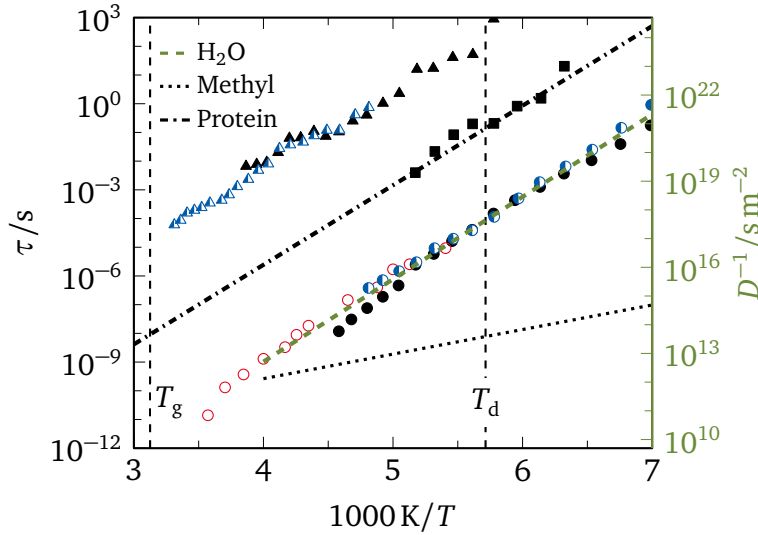


Bild 5.8: Vergleich der beobachteten Dynamik mit Korrelationszeiten aus der Literatur.^{16,27,362} Symbole entsprechen den in Bild 5.1 gezeigten Daten aus NMR und dielektrischer Spektroskopie. Linien sind die beobachteten Temperaturabhängigkeiten aus Bild 5.9.

$q = 0,60 \text{ \AA}^{-1}$ in Bild 5.9 gezeigt ist: Der erste Prozess entspricht der Methylgruppenrotation (gepunktete Linie), der zweite Prozess ist die Translationsbewegung des Hydratwassers (gestrichelte Linie). Dieser Beitrag ist sowohl für Elastin-H₂O als auch Elastin-D₂O notwendig. Für letztgenannte ist der Beitrag aber deutlich geringer. Das lässt den Schluss zu, dass auch in der mit D₂O hydratisierten Probe H₂O- und HDO-Moleküle, sei es durch Isotopenaustausch mit dem Protein oder verunreinigtem Lösungsmittel während der Präparation, vorhanden sind. Eine Folge daraus ist, dass die Signalstärke des Wasserbeitrags in Bild 5.7 für das Elastin-D₂O-System geringer ist als im Elastin-H₂O-System. Der dritte Beitrag der Hochtemperaturkomponente ist durch ein fehlendes Signalmaximum schwierig zu modellieren. Da eine mögliche Ursache das Eintreten der Proteindynamik in das Zeitfenster ist, wurde eine Extrapolation von Prozess II (Quadrate in Bild 5.8) mit $E_m = 0,55 \text{ eV}$ bei Annahme lokaler Reorientierung und einer Verteilungsbreite von $\sigma = 0,03 \text{ eV}$ benutzt (strichpunktierte Linie). Dies reicht aus, um die Messdaten zufriedenstellend zu interpolieren, obwohl nur die Amplituden des Wasser- und des Proteinprozesses freie Parameter während der Anpassung waren.

5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Mithilfe quasielastischer Neutronenstreuung wurde sowohl die Protein- als auch die Hydratwasserdynamik an trockenem Elastin sowie in Elastin-Wasser-Systemen

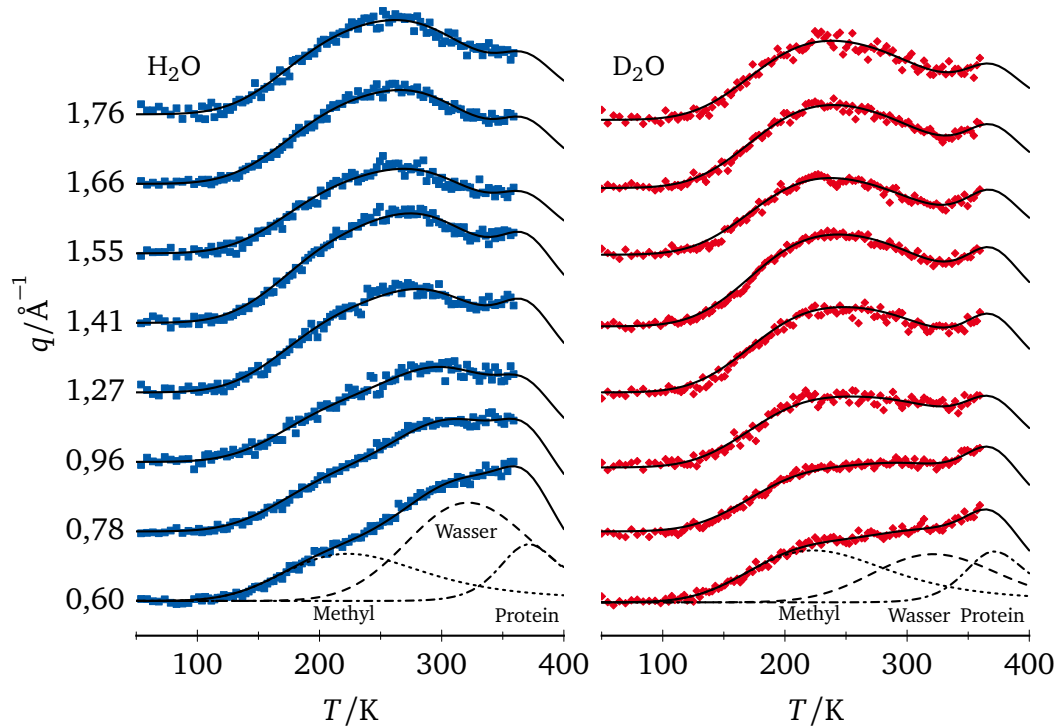


Bild 5.9: Beschreibung der quasielastischen Intensität durch Beiträge der Methylgruppen, des Hydratwassers und des Proteins. Für $q = 0,60 \text{ \AA}^{-1}$ sind neben der Gesamtkurve, die einzelnen Komponenten dargestellt.

untersucht. Unabhängig von Hydratation konnte ein dynamischer Prozess beobachtet werden, der der Rotation von Proteinmethylgruppen zugeordnet werden kann. Dieser Prozess lässt sich durch eine Gaußverteilung von Energiebarrieren beschreiben. Bei Hydratation werden sowohl im mittleren Verschiebungsquadrat als auch in der quasielastischen Intensität zusätzliche Prozesse beobachtet. Der deutlichste zusätzliche Prozess ist dem Hydratwasser zuzuordnen. Dieser kann durch freie Diffusion mit einer Verteilung von Aktivierungsenergien beschrieben werden. Die gefundene Energieverteilung passt sehr gut zu Befunden der Wasserdynamik an Grenz- und Oberflächen.³⁸⁰ In der quasielastischen Intensität gibt es Anzeichen lokaler Proteindynamik, die in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen^{17,109} der Temperaturabhängigkeit des Hydratwassers folgt, aber um mehrere Größenordnungen langsamer ist. Im mittleren Verschiebungsquadrat zeigen die hydratisierten Systeme im Vergleich mit dem trockenen Elastin zwei Änderungen in der Temperaturabhängigkeit: Zum einen der Glasübergangstemperatur T_g aus kalorimetrischen Studien²⁷ und bei einer Temperatur $T_d \approx 180 \text{ K} - 200 \text{ K}$ einen „dynamischen Übergang“.

Der Übergang bei T_g ist zunächst nicht mit dem Slaving-Modell vereinbar, da der für den Glasübergang notwendige α -Prozess Bulklösungsmittel voraussetzt. Dielektrische Spektroskopie an Wasser-Polymer-Systemen legt jedoch nahe, dass die Dynamik des Solvats bereits für Hydratationsgrade von $h \approx 0,2$ an die Viskosität des Lösungsmittels koppelt.³⁸¹ Entfernt man sich daher vom Bulkbegriff, kann es sein, dass in Elastin-Wasser dem α -Prozess ähnliche Dynamik auftritt und diesen Übergang ermöglicht.

Sowohl im Modell von Doster²³ als auch von Ngai et al.²⁵ werden für hydratisierte globuläre Proteine (beispielsweise für C-Phycocyanin¹⁹² und Lysozym²⁶) Übergänge bei der Glasübergangstemperatur T_g . Beide Erklärungsansätze wären somit im Einklang mit der Beobachtung des Übergangs bei $T = 320$ K.

Chen et al. führen den dynamischen Übergang auf eine Änderung der Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten des Hydratwassers von einem fragilen Vogel-Fulcher-Tammann-Gesetz zu einem starken Arrhenius-Gesetz aufgrund eines Flüssig-Flüssig-Phasenübergangs des Wassers bei 225 K zurück.¹⁹⁴ Die gefundene Temperaturabhängigkeit des Hydratwassers, die über den gesamten Temperaturbereich einem Arrhenius-Gesetz folgt, widerspricht jedoch dieser Interpretation und unterstützt Untersuchungen aus NMR,^{16,201} dielektrischer Spektroskopie¹⁷ und quasielastischer Neutronenstreuung.²³ Demnach scheint es unwahrscheinlich, dass das Modell eines Flüssig-Flüssig-Phasenübergangs eine Beschreibung des Elastin-Wasser-Systems darstellt.

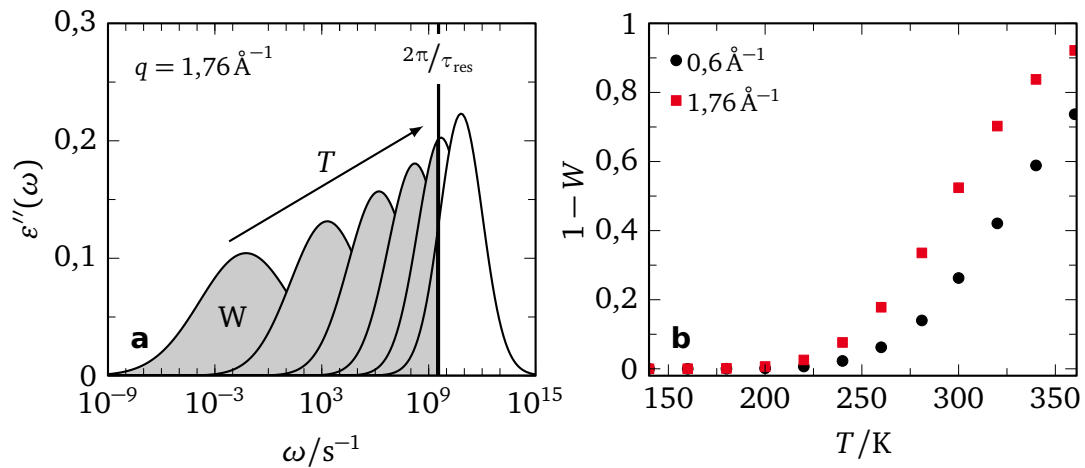


Bild 5.10: (a) Dielektrischer Verlust $\epsilon''(\omega)$ des Hydratwassers für $q = 1,76 \text{ \AA}^{-1}$ aus der Verteilung von Aktivierungsenergien $g(E)$ der quasielastischen Intensität. Grau ausgefüllt ist der Anteil W , der die Bedingung $\omega < 2\pi/\tau_{\text{res}}$ erfüllt. (b) Temperaturabhängigkeit des schnellen Anteils $1-W$ des Verlustes für $q = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$ und $q = 1,76 \text{ \AA}^{-1}$.

Außer in der Interpretation des Übergangs als Fragil-Stark-Übergangs wird eine Änderung des mittleren Verschiebungsquadrats bei T_d erwartet, wenn die Korrelationszeiten des Hydratwassers die experimentelle Zeitskala des Experiments erreichen.^{23,24,382} Um zu überprüfen, bei welcher Temperatur dieser Übergang für hydratisiertes Elastin zu erwarten ist, wurde analog zur Auswertung von Frauenfelder et al.¹⁸ für den kleinsten und den größten ausgewerteten Streuvektor, $q = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$ und $q = 1,76 \text{ \AA}^{-1}$, der dielektrische Verlust $\epsilon''(\omega)$ aus der Verteilung von Aktivierungsenergien berechnet (Bild 5.10a). Die Betrachtung unterschiedlicher Streuvektoren erlaubt es, von den Diffusionskoeffizienten $D(T)$ der Auswertung des Hydratwassers in diesem Kapitel zu Korrelationszeiten $\tau(T)$ zu gelangen. Der Anteil W des dielektrischen Verlustes beschreibt den Anteil des Spektrums, der langsam auf der experimentellen Zeitskala des Neutronstreuexperiments ist, d. h. die Bedingung $\omega > 2\pi/\tau_{\text{res}}$ erfüllt. Der Übergang des mittleren Verschiebungsquadrats sollte in diesem Szenario mit dem Beginn des Anstiegs des schnellen Anteils $1 - W$ zusammenfallen. Für das Elastin-Wasser-System beginnt $1 - W$ im Temperaturbereich von 230 K bis 250 K signifikant anzusteigen (vgl. Bild 5.10b) und liegt damit deutlich oberhalb der Übergangstemperatur T_d . Auch die Betrachtung von Korrelationszeiten des Wasserprozesses in Protein-Wasser-Systemen aus der Literatur in Bild 5.11b würde einen Übergang aufgrund der zeitlichen Auflösung des Experimentes in diesem Temperaturbereich verorten. Es ist daher unwahrscheinlich, dass dies die Ursache für den beobachteten Übergang ist.

Ein Vergleich mit den mittleren Verschiebungsquadraten anderer Protein-Wasser-Systeme in Bild 5.11a weist darauf hin, dass der Übergang in diesem Temperaturbereich eine universelle Eigenschaft hydratisierter Proteine ist. Da dieser Übergang für Untersuchungen, die mit unterschiedlichen zeitlichen Auflösungen durchgeführt wurden, bei nahezu der gleichen Temperatur beobachtet wird, liegt die Vermutung nahe, dass ihm eine dem Glasübergang ähnliche Ursache zugrunde liegt. Der langsamste Prozess des hydratisierten Elastins in Bild 5.8, der mit kooperativer Dynamik im Proteinsystem verknüpft wird,²⁷ erreicht in diesem Temperaturbereich die Zeitskala von 1000 s und könnte möglicherweise ähnliche Effekte wie ein Glasübergang auslösen.

Als weitere Möglichkeit, diesen dynamischen Übergang zu interpretieren, kann ein Glasübergang des Hydratwassers in Betracht gezogen werden. Betrachtet man Prozess I von Samouillan et al. oder die Temperaturabhängigkeit der in Bild 5.11b gezeigten Korrelationszeiten des Lysozysystems, lässt sich bei etwa $T \approx 190 \text{ K}$ eine schwache Änderung der Temperaturabhängigkeit beobachten. Eine solche Änderung wurde auch in anderen Dielektrikuntersuchungen u. a. von Wasser in Proteinsystemen und in Silikaporen beobachtet.^{385–387} Zusätzlich werden in Positronen-Annihilations-Lebensdauer-Spektroskopie und NMR-Untersuchungen Hinweise auf

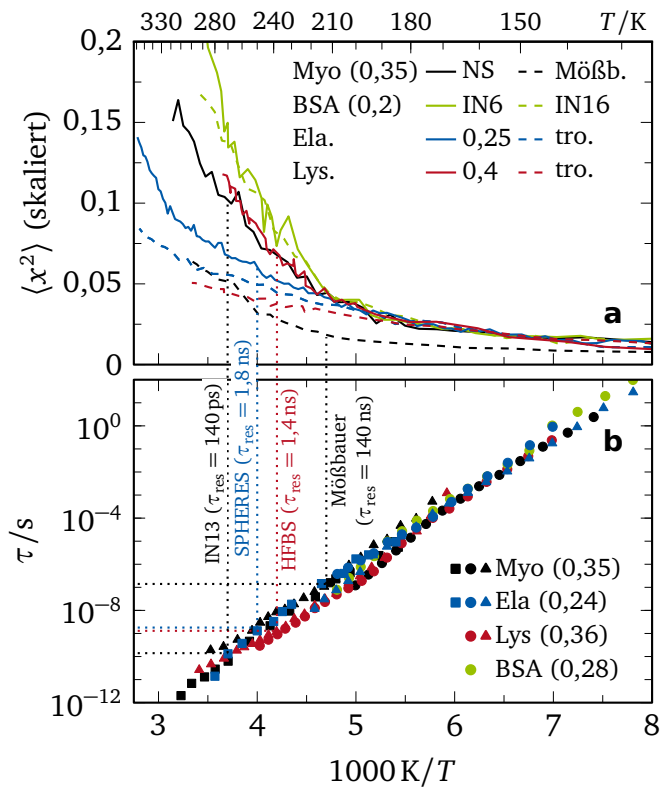


Bild 5.11: (a) Vergleich der Temperaturabhängigkeit mittlerer Verschiebungsquadrate: Blau: hydratisiertes (durchgezogene Linie) und trockenes Elastin (gestrichelt), rot: hydratisiertes (durchgezogen) und trockenes Lysozym (gestrichelt),³⁸³ grün: Rinderalbumin (BSA) an Rückstreuenspektrometern IN6 (durchgezogen) und IN16 (gestrichelt) aufgenommen,¹⁷⁸ schwarz: hydratisiertes Myoglobin mit QENS (durchgezogen) und mit Mößbauer-Spektroskopie (gestrichelt) aufgenommen.²⁷⁴ (b) Korrelationszeiten des Wasserprozesses für die gezeigten Proteine: An Myoglobin (schwarz) aus $^2\text{H-NMR}$ ¹⁴⁶ (Quadrate) und dielektrischer Spektroskopie (Kreise,¹⁷ Dreiecke¹⁵⁵); an Elastin (blau) aus $^2\text{H-NMR}$ ¹⁶ (Quadrate) und dielektrischer Spektroskopie (Kreise,²⁸ Dreiecke²⁷); an Lysozym (rot) aus dielektrischer Spektroskopie (Kreise,²⁰ Dreiecke¹⁵⁵); BSA (grün) aus dielektrischer Spektroskopie.³⁸⁴ Zahlen geben den Hydratationsgrad an. Gestrichelte Linien kennzeichnen die Position, an der der Wasserprozess auf der experimentellen Zeitskala ist.

einen Glasübergang von Wasser in eingeschränkten Geometrien bei $T \approx 190\text{ K}$ gefunden.^{240,388,389} In diesem Kontext kann Prozess I als β -Prozess des Hydratwassers gesehen werden, dessen Temperaturabhängigkeit sich beim Glasübergang des nicht beobachteten α -Prozesses ändert.³⁹⁰ Das Elastin-Wasser-System würde in diesem Fall anderen Mischungen, z. B. Polymer-Lösungsmittel-Mischungen, ähneln, die häufig zwei Glasübergänge aufweisen.^{391,392}

Das würde zur Interpretation von Doster¹⁹² passen, in der ein Übergang bei der Glasübergangstemperatur des α -Prozesses des Wassers erwartet wird. Allerdings würde dies den Glasübergang als Ursache des Übergangs bei $T = 320\text{ K}$ in Frage stellen. Es ist in diesem Bild nicht möglich, beide Übergänge gleichzeitig zu erklären.

Abschließend lässt sich sagen, dass keines der Modelle, die bisher zur Beschreibung der Protein-Wasser-Wechselwirkung verwendet wurden, alle Beobachtungen zufriedenstellend erklären kann. Zudem zeigen neuere Untersuchungen quasielastischer Neutronenstreuung in nicht hydratisiertem Protein und MD-Simulationen eines Polymer-Toluol-Systems ebenfalls Anzeichen eines dynamischen Übergangs.^{173,174,393} Durch Nutzung eines nicht glasbildenden Lösungsmittels ist es hingegen möglich einen dynamischen Übergang zu unterdrücken.³⁹⁴ Auch für diese Systeme sind die Erklärungsansätze der Literatur zum dynamischen Übergang nicht uneingeschränkt anwendbar. Es ist daher festzuhalten, dass der dynamische Übergang alleine nicht ausreicht, um Aussagen über Protein-Lösungsmittel-Systeme zu machen, da unterschiedlichste Faktoren, die vergleichbare Effekte haben, eine Rolle spielen können.

6 NMR: ELASTIN IN GLYCERIN UND WASSER-GLYCERIN-MISCHUNGEN

Hydratisiertes Elastin wurde nicht nur im vorigen Kapitel, sondern auch in der Literatur sowohl hinsichtlich der Lösungsmittel- als auch hinsichtlich der Proteindynamik untersucht.^{16,27,248,291,395} Allerdings wird die Proteindynamik durch die Wahl des Lösungsmittels, insbesondere aufgrund einer veränderten Viskosität, beeinflusst.^{138,162,320,321}

Daher wird in diesem Kapitel der Einfluss des Lösungsmittels auf die Proteindynamik anhand von ^{13}C -CPMAS-Spektren für reines Glycerin und Wasser-Glycerin-Mischungen als Lösungsmittel untersucht. Für das reine Glycerin soll durch Variation des Solvationsgrads der Frage nachgegangen werden, wann ein Einsetzen von Proteindynamik zu beobachten ist und ob sich daraus Regelmäßigkeiten für die Aktivierung der Proteindynamik ableiten lassen. Der Einfluss der Lösungsmittelviskosität auf die Proteindynamik wird sowohl durch Änderung der Mischungsverhältnisse des binären Lösungsmittels als auch durch Änderung der Temperatur untersucht. Ob und wie das Elastin sich auf die Dynamik in binären Lösungsmitteln auswirkt, soll mithilfe von ^2H -NMR an Glycerin in Wasser-Glycerin-Systemen verschiedener Mischungsverhältnisse geklärt werden.

6.1 Dynamik in Elastin-Glycerin-Mischungen

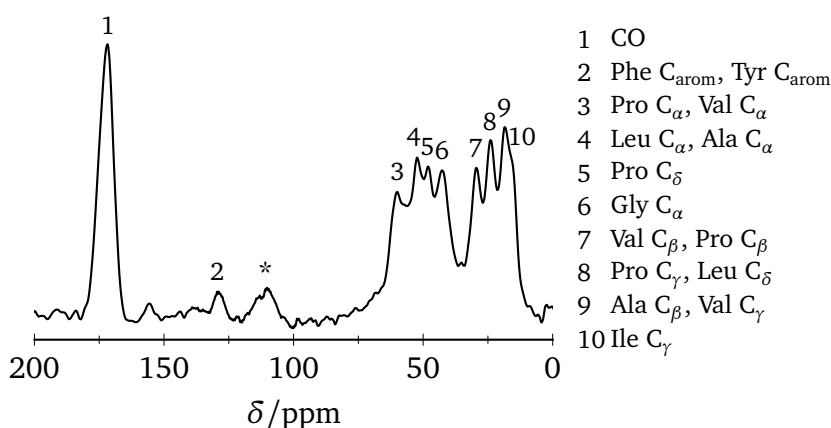


Bild 6.1: Zuordnung der Resonanzen nach Papaioannou et al.³⁹⁶ am ^{13}C -CPMAS-Spektrum von trockenem Elastin bei Raumtemperatur. Der Stern kennzeichnet die Position der Rotationsseitenbande des CO-Signals.

Vor der Diskussion des Lösungsmiteleinflusses erfolgt am ^{13}C -CPMAS-Spektrum des trockenen Elastins in Bild 6.1 eine Zuordnung der beobachteten Resonanzlinien zu Aminosäuren des Proteins nach Papaioannou et al.³⁹⁶ Da die Zusammensetzung

Trockenes
Elastin

von Elastin durch einige wenige Aminosäuren dominiert ist (vgl. Bild D.1), sind die Resonanzen im Vergleich zu den Spektren anderer Proteine deutlich voneinander getrennt. Das Spektrum lässt sich in drei größere Einheiten unterteilen:

- Die Carbonylgruppen der Peptidbindungen lassen sich der Resonanzlinie bei 170 ppm (1) zuordnen.
- Im Bereich von 70 ppm bis 40 ppm treten vier Resonanzlinien auf (3-6), die durch die aliphatischen Kohlenstoffatome C_α der Aminosäuren im Proteinrückgrat verursacht werden.
- Die Resonanzen zwischen 30 ppm und 15 ppm (7-10) sind auf Beiträge von Seitenkettenatomen der Aminosäuren zurückzuführen.

Zusätzlich erzeugen die aromatischen Verbindungen von Phenylalanin und Threonin ein Signal bei 125 ppm (2). Ein Artefakt des Magic Angle Spinings (Abschnitt 3.4) ist die Rotationsseitenbande der Carbonylgruppen bei 110 ppm.³⁹⁷ Da an den Carbonylgruppen keine direkt gebundenen Wasserstoffatome für einen wohldefinierten Polarisationstransfer vorhanden sind (vgl. Bild 3.16), werden sie im Folgenden nicht zur Diskussion der Ergebnisse herangezogen.

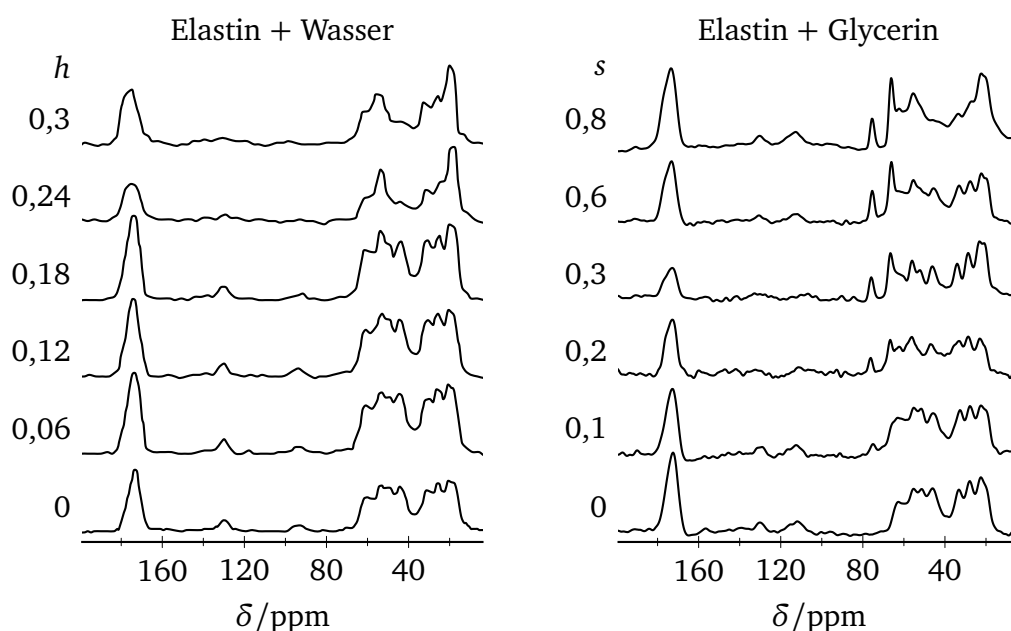


Bild 6.2: ^{13}C -NMR-Linienform des Elastins in Abhängigkeit von der Lösungsmittelmenge mit Wasser²⁴⁸ und Glycerin als Lösungsmittel.

Solvations-
grad-
abhängigkeit

Die Linienform des ^{13}C -NMR-Spektrums von Elastin in Bild 6.2 ändert sich sowohl bei Erhöhung des Glycerinanteils s als auch bei Erhöhung des Hydratationsgrads h .²⁴⁸ Für niedrige Wasserkonzentrationen ($h < 0,24$) ist kein Einfluss des Lösungsmittels auf

die Linienform erkennbar, sie entspricht der des trockenen Elastins. Oberhalb dieser Grenze ist die Signalintensität für Linien, die Valin, Prolin oder Glycin zugeordnet werden (3, 5, 6, 7), stark reduziert, sodass deren Auflösung nicht mehr möglich ist. Resonanzlinien, die durch Methylgruppen hervorgerufen werden (9, 10) oder Alanin bzw. Leucin (4) zugeordnet werden, sind hingegen nur wenig durch diesen Übergang beeinflusst. Reduzierte Signalintensität ist ein Anzeichen dafür, dass die beobachtete Dynamik auf der Zeitskala des CPMAS-Experiments liegt.²⁵⁸ Elastindynamik, deren Einsetzen in anderen Untersuchungen bei einem Hydratationsgrad ab $h = 0,18 - 0,24$ festgestellt wird,^{27,398} ist somit in einer Änderung der Linienform erkennbar. Der Einfluss der Hydratation auf Linien der drei Aminosäuren Valin, Prolin und Glycin stimmt mit dem Befund überein, dass diese als Bestandteil der Peptidreihe VPGVG für die dynamischen und elastischen Eigenschaften des Elastins verantwortlich sind.²⁹⁹⁻³⁰²

In den Elastin-Glycerin-Systemen erscheinen zusätzlich zu den Proteinsignalen zwei Linien bei 73 ppm und 64 ppm, die der CH_2 - bzw. der CH-Gruppe von Glycerin zugeordnet werden können.³⁹⁹ Im Vergleich zum hydratisierten Elastin ist bis zu einem Solvatationsgrad von $s = 0,6$ keine Änderung in der Signalintensität oder Linienform für das Protein zu erkennen. Erst bei Überschreiten dieses Wertes tritt ein Linienformübergang wie im Elastin-Wasser-System auf, was auf das Einsetzen großamplitudiger Elastindynamik bei einem Solvatationsgrad $s \geq 0,6$ hinweist.

Eine mögliche gemeinsame Größe, aus der die jeweilige kritische Konzentration für den Linienformübergang folgt, ist die mittlere Zahl N_{HB} der Wasserstoffbrückenbindungen, die vom Lösungsmittel pro Aminosäure zur Verfügung gestellt werden. Sie kann über

$$N_{\text{HB}} = s \cdot \frac{M_{\text{mol,prot}}}{M_{\text{mol,solv}}} \cdot \frac{\text{Zahl der Wasserstoffbrücken}}{\text{Zahl der Aminosäuren}} \quad (6.1)$$

aus dem Solvatationsgrad s bzw. dem Hydratationsgrad h abgeschätzt werden. In Molekulardynamiksimulationen der Bulklösungsmittel wird eine mittlere Zahl ausgebildeter Wasserstoffbrückenbindungen von 3,3 je Wassermolekül und von 5,7 je Glycerinmolekül angegeben.⁴⁰⁰ Zusammen mit den in Abschnitt 4.1 gegebenen Werten für Molekulargewicht und Zahl der Aminosäuren liegt N_{HB} im Fall des Elastin-Wasser-Systems zwischen 2,8 ($h = 0,18$) und 3,8 ($h = 0,24$), für das Elastin-Glycerin-System nimmt N_{HB} Werte zwischen 3,2 ($s = 0,6$) und 4,2 ($s = 0,8$) an. Großamplitudige Fluktuationen des Proteins setzen daher möglicherweise dann ein, wenn durch das Lösungsmittel dem Protein eine ausreichend große Anzahl an Wasserstoffbrücken bereitgestellt werden, im Fall des Elastins also drei bis vier pro Aminosäuren.

Bei einem mittleren Solvatationsgrad von $s \approx 0,3$ scheinen die Resonanzen des Elastin-Glycerin-Systems eine geringere Linienbreite zu besitzen und deutlicher

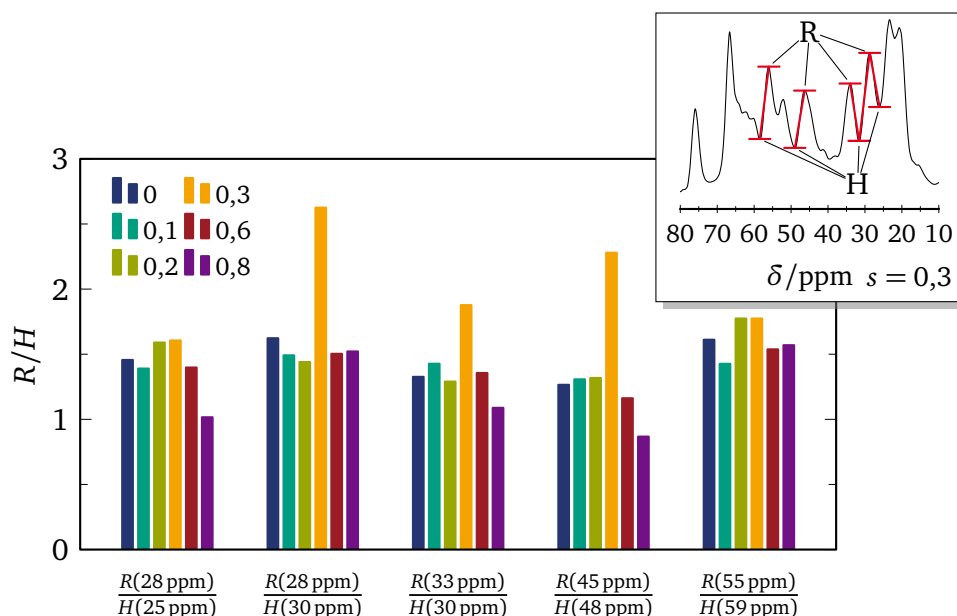


Bild 6.3: Relative Höhe der Resonanzlinien der untersuchten Solvationsgrade. Im Nebensbild sind am Beispiel des Elastinspektrums mit $s = 0,3$ die gewählten Maxima R und Minima H eingezeichnet.

getrennt zu sein als bei niedrigeren Solvationsgraden. Für das hydratisierte Elastin ist diese Änderung der Linienform nicht zu beobachten. Dynamik bei niedrigen Hydratationsgraden, wird in hydratisierten Proteinen meist der kleinamplitudigen Bewegung polarer Seitenketten zugeordnet.^{17,362,401} Eine Verringerung der Linienbreite lässt sich anhand der relativen Höhe R/H der Resonanzen, d. h. dem Verhältnis aus Signalmaximum R zu Signalminimum H , untersuchen. Aus schmalen Linien ergeben sich niedrigere Minima zwischen Resonanzen und somit höhere Werte für R/H . Betrachtet man die relativen Höhen in Bild 6.3, deuten die höheren Werte bei $s = 0,3$ auf geringere Linienbreiten der Signale bei $\delta = 33 \text{ ppm}$ und $\delta = 45 \text{ ppm}$ hin. Wie auch beim Linienformübergang bei $s = 0,6$ sind hauptsächlich Aminosäuren betroffen, die für die Elastizität von Bedeutung sind. Da sich die Kohlenstoffbindungen, die diesen Resonanzlinien zugeordnet werden, in Seitenketten befinden, kann eine mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen im Einsetzen kleinamplitudiger Bewegung der Seitenketten liegen. Diese würde über eine Verteilung isotroper chemischer Verschiebungen mitteln und die Linienbreiten verringern.^{157,247,402} Wird der Glycerinanteil auf $s = 0,6$ und mehr erhöht, verringert sich der Wert von R/H wieder. Dies liegt vermutlich daran, dass die Effekte großamplitudiger Bewegung (reduzierte Intensität, größere Linienbreiten) die Effekte kleinamplitudiger Dynamik überlagern.

Die Verwendung von Glycerin als Lösungsmittel des Elastins scheint einen qualitativ ähnlichen Effekt wie Wasser auf die Proteindynamik zu haben. Beide erlauben das Auftreten von großamplitudigen Fluktuationen, wenn dem Protein eine solvensabhängige kritische Konzentration des Lösungsmittels zur Verfügung steht. Für Glycerin werden zudem Anzeichen von kleinamplitudiger Bewegung bei niedrigeren Konzentrationen gefunden. Dies ist in Einklang mit dem Bild für hydratisierte Proteine von Frauenfelder et al., die kleinamplitudige Fluktuationen auf eine gekoppelte Bewegung von Lösungsmittel und der Proteinoberfläche zurückführen, während großamplitudige Fluktuationen Bulklösungsmittel benötigen.^{18,45}

6.2 Elastindynamik in Elastin/Wasser-Glycerin-Mischungen

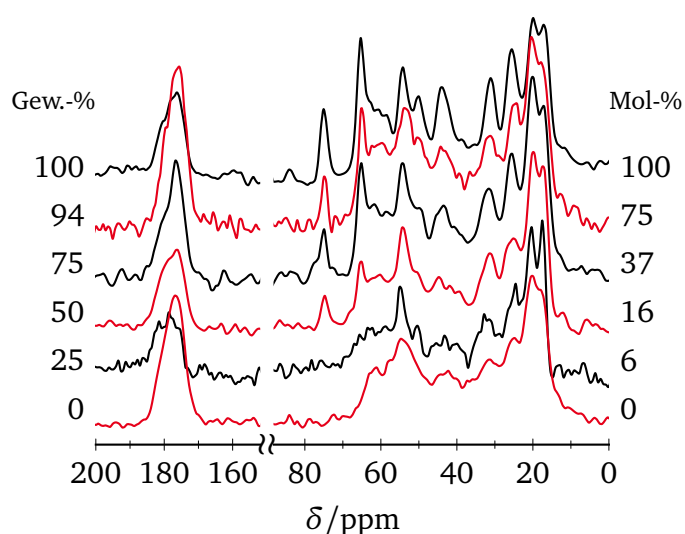


Bild 6.4: ^{13}C -CPMAS-Spektren von Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen bei 295 K. Zur besseren Darstellung wurden die Spektren vertikal verschoben. Angegeben sind die Glycerinanteile am Lösungsmittel.

Um die Abhängigkeit der Proteindynamik vom umgebenden Lösungsmittel zu untersuchen, wurden ^{13}C -CPMAS-Spektren von Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen aufgenommen.* Das Mischungsverhältnis des binären Lösungsmittels wurde bei konstantem Solvatationsgrad $s = 0,3$ zwischen den Grenzfällen reinen Wassers und reinen Glycerins variiert. Mit steigendem Glycerinanteil wird so gleichzeitig die Viskosität und die Molekülzahl des Lösungsmittels verändert. Bild 6.4 zeigt die Abhängigkeit der ^{13}C -CPMAS-Spektren des Elastins vom verwendeten Lösungsmittel

* Messungen wurden im Rahmen der Bachelorarbeiten von Daniel Malzacher⁴⁰³ und Niels Haase⁴⁰⁴ durchgeführt.

bei einer Temperatur von 295 K. Die beiden Grenzfälle wurden bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben: Das Spektrum des reinen Glycerinsystems zeigt als Anzeichen kleinamplitudiger Dynamik aliphatische Resonanzlinien mit verringerter Linienbreite; das des reinen Wassersystems als Zeichen großamplitudiger Dynamik verringerte Signalintensität und schlecht aufgelöste Linien. Beide Glycerinsignale bei 64 ppm und 73 ppm nehmen wie erwartet mit sinkendem Glycerinanteil in der Intensität ab und sind bei Anteilen von unter 25 Gew.-% Glycerin nicht mehr aufzulösen. Auch die Linienform des Proteins selbst zeigt einen kontinuierlichen Übergang zwischen den Grenzfällen der reinen Protein-Solvens-Systeme.

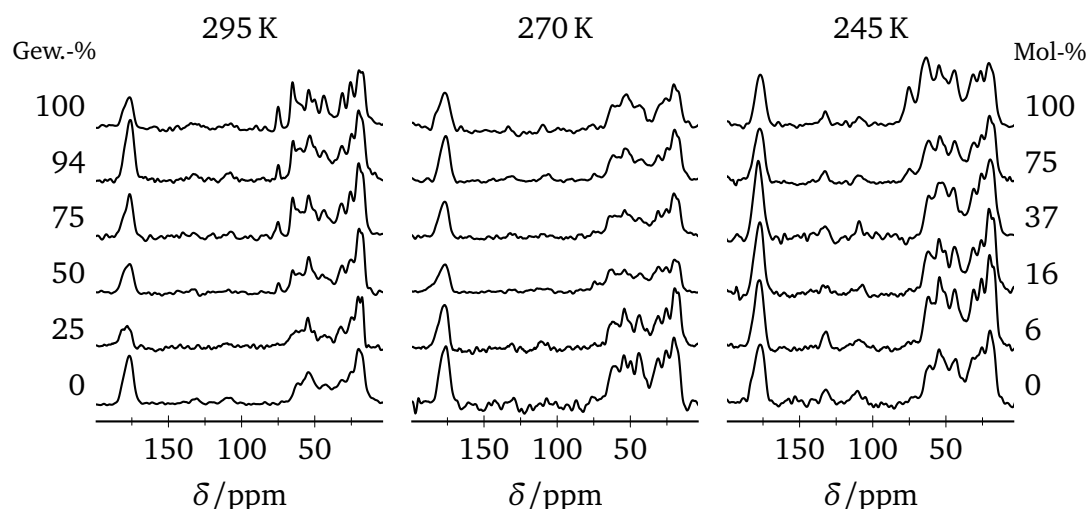


Bild 6.5: Temperaturabhängigkeit der ^{13}C -CPMAS-Spektren von Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen. Zur besseren Übersicht wurden die Spektren vertikal verschoben.

Temperatur-
abhängigkeit

In Bild 6.5 sind ^{13}C -NMR-Spektren für die bereits gezeigte Temperatur $T = 295\text{ K}$ und für die Temperaturen 245 K und 270 K dargestellt. Bei der tiefsten untersuchten Temperatur von 245 K wird in der Linienform keine Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis des Lösungsmittels beobachtet. Alle aufgenommenen Spektren erinnern in ihrer Linienform an das trockene, d. h. statische Elastin, womit sich eventuell vorhandene Proteindynamik auf einer Zeitskala jenseits von 10^{-5} s befindet. Diese Spektren weisen zudem eine höhere Signalintensität auf, was ein Zeichen besseren Polarisationstransfers sein kann. Zudem ist die Linienbreite der Glycerinsignale im Vergleich zu 295 K deutlich angestiegen, was auf fehlende Mittelung anisotroper Wechselwirkungen hinweist.

Die Mischungsabhängigkeit der Linienform bei 270 K stellt sich komplexer als für die anderen betrachteten Temperaturen dar. Die erste Beobachtung ist, dass statt einer kontinuierlichen Mischungsabhängigkeit eine Unterteilung in glycerinreiche

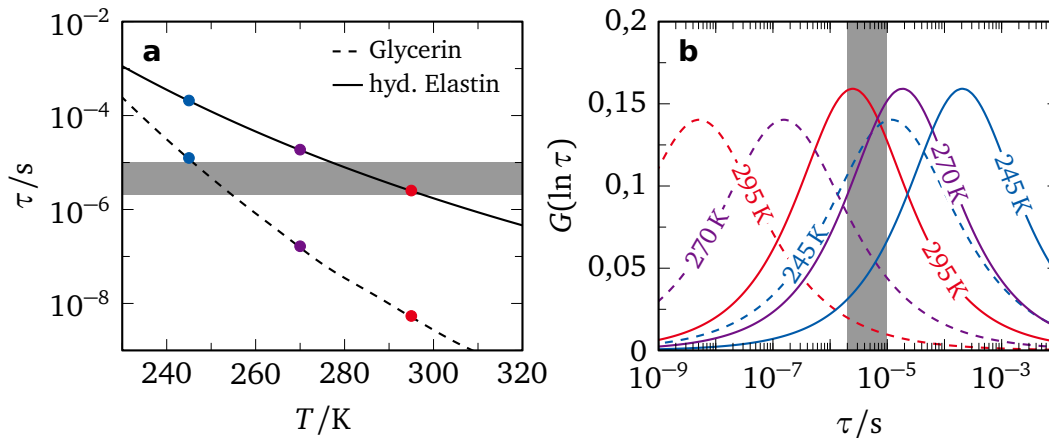


Bild 6.6: (a) Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeit von Glycerin an Elastin¹⁴⁷ und von hydratisierten Elastin²⁷ (Prozess III in Bild 5.1). (b) Korrelationszeitenverteilungen für Glycerin und hydratisiertes Elastin für 245 K, 270 K und 295 K. Die experimentelle Zeitskala der heteronuklearen Entkoppelung und des Polarisationstransfers (vgl. Abschnitt 3.4) ist durch den ausgegrauten Bereich dargestellt.

(≥ 50 Gew.-%) und glycerinarme (< 50 Gew.-%) Systeme vorgenommen werden kann. Die Spektren glycerinreicher Systeme sind in der Signalintensität im Vergleich zu den Hoch- und Tieftemperaturspektren deutlich reduziert. Eine größere Linienbreite der Resonanzlinien im aliphatischen Bereich führt zu einer größeren Überlappung und einer schlechteren Zuordnung der einzelnen Resonanzlinien. Die Intensität der glycerinarmen Spektren nimmt bei Erniedrigung der Temperatur auf 270 K zu und einzelne Resonanzlinien sind getrennt voneinander zu beobachten. Insbesondere das Spektrum von Elastin in reinem Wasser (0 Gew.-%) besitzt bereits bei 270 K eine zum trockenen Elastin ähnliche Linienform (vgl. Bild 6.1). Der Übergang zur statischen Linienform zwischen 295 K bis 270 K für das Elastin-Wasser-System lässt sich mit Hilfe der Korrelationszeiten von Samouillan et al.²⁷ erklären, die bereits im vorigen Kapitel zur Diskussion herangezogen wurden (vgl. Bild 5.1). Der kooperative Prozess des Proteins findet bei $T = 295$ K auf der Zeitskala des CPMAS-Experiments statt und ist für die tieferen Temperaturen jenseits des experimentellen Zeitfensters (Bild 6.6b). Die Unterscheidung zwischen glycerinarmen und -reichen Systeme liegt wahrscheinlich in den Bewegungstypen begründet, die durch das Lösungsmittel ermöglicht werden. In glycerinarmen Systeme existieren großamplitudige Fluktuationen, die bei 270 K bereits langsam auf der experimentellen Zeitskala erscheinen. Für glycerinreiche Systeme treten hingegen nur kleinamplitudige Fluktuationen auf, die erst bei dieser Temperatur die experimentelle Zeitskala kreuzen und die Linienform beeinflussen.

Die zweite Beobachtung in den Spektren bei 270 K ist ein Fehlen beider Glycerinsignale für alle Systeme, sogar für das reine Glycerinsystem. Dies deutet darauf hin, dass sich die beobachtete Glycerindynamik auf einer Zeitskala im Mikrosekundenbereich ereignet. Allerdings ist die mittlere Korrelationszeit, die in ^2H -NMR-Experimente bestimmt wurde,¹⁴⁷ für die gegebene Temperatur um über eine Größenordnung kürzer, wie Bild 6.6a zeigt. Betrachtet man allerdings die Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ aus Spin-Gitter-Relaxationsmessungen, existieren bei dieser Temperatur bereits Anteile der Verteilung auf der experimentellen Zeitskala (Bild 6.6b). Eine genauere Analyse der Glycerindynamik im Laufe dieses Abschnitts zeigt zudem im Tieftemperaturbereich die Existenz einer zweiten langsameren Komponente. Die Verteilung weist daher einen größeren Anteil langsamer Dynamik auf als in Bild 6.6b dargestellt, wo diese langsame Glycerinmoleküle nicht berücksichtigt werden. Molekulardynamiksimulationen zeigen zudem, dass die Lösungsmitteldynamik mit zunehmender Nähe zur Proteinoberfläche verlangsamt wird.^{126,138,305,405} Dass Dynamik sowohl des Elastins als auch des Glycerins auf einer ähnlichen Zeitskala beobachtet wird, könnte daher ein Zeichen sein, dass eine Kopplung zwischen dynamischen Prozessen beider Komponenten besteht.

Die Untersuchung der Elastindynamik mittels ^{13}C -CPMAS-NMR-Spektren bei Variation der Temperatur und der Lösungsmittelzusammensetzung zeigte, dass eine kontinuierliche Erhöhung der Viskosität die Möglichkeit großamplitudiger Bewegung erniedrigt, während kleinamplitudige Bewegung erhalten bleibt. Beide Bewegungsarten haben bei $T = 245\text{ K}$ die Zeitskala 10^{-5} s überschritten. Dass großamplitudige Fluktuationen nur für Solvensmischungen mit niedriger Viskosität beobachtet werden, steht nicht im Widerspruch zum Slaving-Modell, es finden sich aber Zeichen einer Kopplung der Lösungsmitteldynamik an die Proteindynamik. Dies unterstützt die Beobachtung früherer Untersuchungen,^{20,164,186} dass anstelle der einseitigen Beeinflussung des Proteins durch das Lösungsmittel des Slaving-Modells eine wechselseitige Einflussnahme zwischen den Komponenten herrscht.

6.3 Glycerindynamik in Elastin/Wasser-Glycerin

Für Mischungsverhältnisse von 50 Gew.-% und 75 Gew.-% Glycerin wurde die Glycerindynamik bei konstantem Solvatationsgrad von $s = 0,3$ untersucht.[†] Der Einfluss des Solvatationsgrads wird eingehender anhand des Vergleichs der 75 Gew.-%-Mischung mit einem erhöhten Solvatationsgrad von $s = 0,6$ untersucht. (vgl. Tabelle 6.1).

Spin-Gitter-
Relaxation

Bild 6.7 zeigt für jede der untersuchten Systeme Aufbaukurven für ausgewählte Temperaturen. Im Hochtemperaturbereich (rote Dreiecke) kann der Magnetisie-

[†] Messungen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Wida Koshekhan⁴⁰⁶ durchgeführt.

Tabelle 6.1: Mischungsverhältnisse und Solvatationsgrad s der untersuchten Wasser-Glycerin-Mischungen. Probenbezeichnungen beziehen sich auf den Anteil des Glycerins in Gewichtsprozent. Die Farben werden in den folgenden Abbildungen zur Unterscheidung der Systeme verwendet.

Bezeichnung	Verhältnis Wasser : Glycerin		Solvatationsgrad s
	Mol	Masse	
50 Gew.-%	84 : 16	50 : 50	0,3
75 Gew.-%	63 : 37	25 : 75	0,3
75 Gew.-%, (0,6)	63 : 37	25 : 75	0,6

rungsaufbau mit Gleichung (3.62) durch eine Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion interpoliert werden. Bei tiefen Temperaturen (blaue Kreise) wird stattdessen ein zweistufiger Aufbau

$$\frac{M(t)}{M_0} = 1 - \left\{ c \exp \left[- \left(\frac{t}{T_{1,1}} \right)^{\beta_1} \right] + (1 - c) \exp \left[- \left(\frac{t}{T_{1,2}} \right)^{\beta_2} \right] \right\} \quad (6.2)$$

beobachtet. Ein zweistufiger Magnetisierungsaufbau wird auch in ^2H -NMR-Untersuchung wasserstoffbrückenbildender Systeme in hartem Confinement gefunden.^{39,240,407–409} Der Anteil der langsamen Komponente nimmt mit steigender Temperatur ab. Dadurch existiert ein Temperaturbereich (violette Quadrate), in dem ein einstufiger Aufbau den Kurvenverlauf schlecht widerspiegelt, eine Anpassung mit Gleichung (6.2) aber unzuverlässige Parameter ergibt. Für diese Temperaturen wurde auf die Beschreibung mit Hilfe der Mittag-Leffler-Funktion

$$\frac{M(t)}{M_0} = 1 - E_{\beta} \left[- \left(\frac{t}{T_1} \right)^{\beta} \right] \quad (6.3)$$

zurückgegriffen. Damit kann sowohl die schnelle Komponente parametrisiert werden als auch der Kurvenverlauf ganzheitlich nachgebildet werden.

Die Parameter, die aus der Auswertung des Magnetisierungsaufbaus folgen, sind in Bild 6.8 und Bild 6.9 abgebildet. Für das 50 Gew.-%-Bulksystem wird Kristallisation von Wasserclustern erwartet,³²³ was bei $T \approx 227\text{ K}$ zum Sprung in der Temperaturabhängigkeit der T_1 -Werte führt. Anzeichen für Kristallisation sind im Proteinsystem hingegen nicht auszumachen. Die Positionen der T_1 -Minima der Proteinsysteme liegen sowohl in Temperatur als auch in Höhe über denen der Bulksysteme. Mit höherem Glycerinanteil bei gleichbleibendem Solvatationsgrad verschiebt sich das Minimum von 265 K zu 278 K, liegt jedoch unverändert bei einer

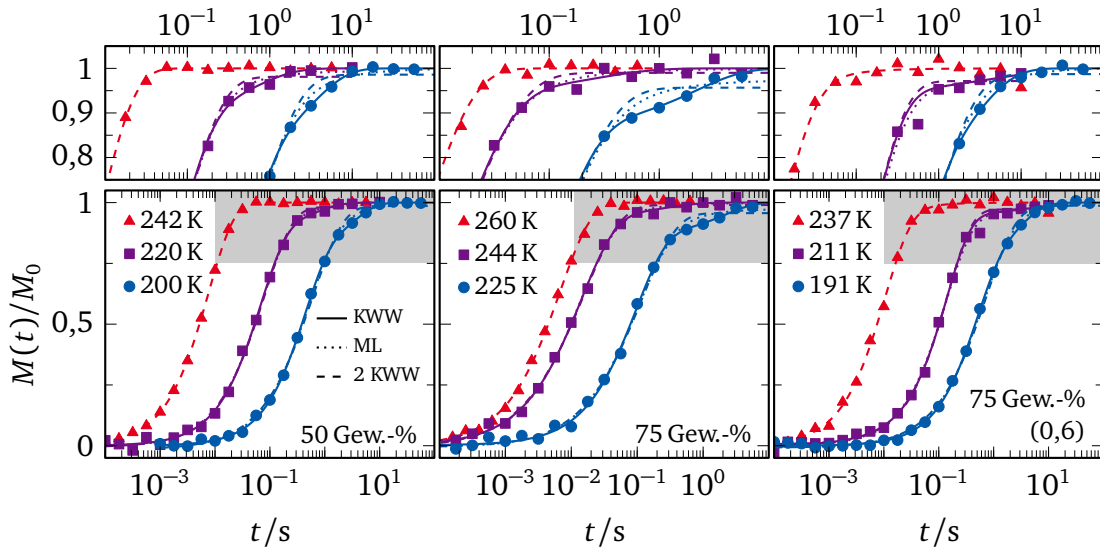


Bild 6.7: Magnetisierungsaufbau $M(t)$ von Glycerin- d_5 in Wasser-Glycerin-Mischungen an Elastin bei ausgewählten Temperaturen. Die obere Reihe zeigt vergrößert den grau hinterlegten Bereich der Aufbaukurven. Linien sind Anpassungen verschiedener Modelle an Messdaten: KWW-Funktion (gestrichelt), ML-Funktion (gepunktet), zwei KWW-Funktionen (durchgezogen).

Höhe von 5,7 ms. Erhöhung des Solvatationsgrads von $s = 0,3$ auf $s = 0,6$ führt zu einer Änderung der Temperatur des Minimums von 265 K zu 275 K und der Höhe von $\langle T_1 \rangle_{\min} = 5,7$ ms zu $\langle T_1 \rangle_{\min} = 4,8$ ms. Bei Annahme einer Cole-Cole-förmigen Spektraldichte lassen sich Streckungsparameter $\alpha = 0,50$ für das höher gelegene Minimum und $\alpha = 0,58$ für das niedrige Minimum bestimmen. Die Werte sind von ähnlicher Größenordnung wie sie aus früheren Untersuchungen an Protein-Wasser- und Protein-Glycerin-Systemen gewonnen wurden.^{16,37,146,155} Der Wechsel von der Beschreibung durch eine KWW-Funktion zu der durch die ML-Funktion zeigt das Auftreten einer weiteren dynamischen Komponente an. Für beide Systeme mit einem Glycerinanteil von 75 Gew.-% tritt der Übergang bei etwa 235 K ein, für das System mit weniger Glycerin bei 220 K. Die langsame Glycerinkomponente ist für das 75 Gew.-%-System am deutlichsten ausgeprägt. Die T_1 -Werte der langsamen Stufe sind über eine Größenordnung höher als die der schnellen Stufe und steigen kontinuierlich mit sinkender Temperatur.

Die Temperaturabhängigkeit der Reduktionsfaktoren M in Bild 6.9 zeigt ähnliche Abhängigkeiten vom Mischungsverhältnis und Solvatationsgrad wie die Relaxationszeiten. Das Minimum der Magnetisierung wird für die 75 Gew.-%-Mischung bei 232 K beobachtet, das der 50 Gew.-%-Mischung bei 225 K. Die 75 Gew.-%-Mischung

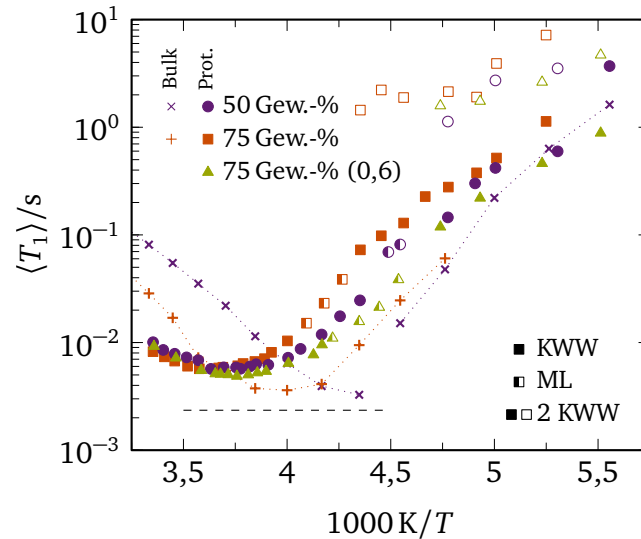


Bild 6.8: Temperaturabhängigkeit der mittleren Spin-Gitter-Relaxationszeit $\langle T_1 \rangle$ von Glycerin im Proteinsystem im Vergleich mit Bulksystemen.⁴⁰⁸ Gestrichelte Linie kennzeichnet die erwartete Höhe des Minimums bei einer exponentiellen Korrelationsfunktion, gepunktete Linien dienen der Orientierung.

mit höherem Solvatationsgrad ist das System mit der niedrigsten Temperatur des Minimums bei 215 K. Wie bei anderen Proteinsystemen^{16,146,147} ist auch im Minimum für alle Systeme noch Magnetisierung detektierbar. Die Intensität der langsamen Komponente durchläuft kein Minimum, sondern steigt kontinuierlich mit sinkender Temperatur an. Sie ist stärker ausgeprägt für die Systeme mit geringem Solvatationsgrad und dort wiederum proportional zum Glycerinanteil.

Beide Größen zeigen Effekte, welche die gleichen Schlüsse zulassen: Bei gleichbleibendem Solvatationsgrad beschleunigt die Glycerindynamik mit steigendem Wasseranteil, wie die erhöhten Temperaturen nahelegen, bei denen das T_1 -Minimum bzw. Signalminimum beobachtet werden. Durch das Protein wird jedoch die Abhängigkeit der Dynamik vom Mischungsverhältnis reduziert, wie der Vergleich mit den Bulk-mischungen zeigt. Die Zusammensetzung des Lösungsmittels scheint die unterliegende Korrelationszeitenverteilung nur schwach zu beeinflussen, da die Höhe des T_1 -Minimums für beide Systeme gleich ist. Auch die detektierte Magnetisierung der schnellen Glycerinkomponente im Signalminimum ändert sich nur schwach mit dem Glycerinanteil. Die Erhöhung des Solvatationsgrad führt ebenfalls zu einer beschleunigten Dynamik. Zusätzlich gibt es Anzeichen in Form des niedrigeren T_1 - und Signalminimums, dass die Verteilungsbreite reduziert ist. Sowohl die Relaxationszeiten als auch der Reduktionsfaktor deuten darauf hin, dass die 75 Gew.-%-Mischung mit niedrigem Solvatationsgrad im Temperaturbereich zwi-

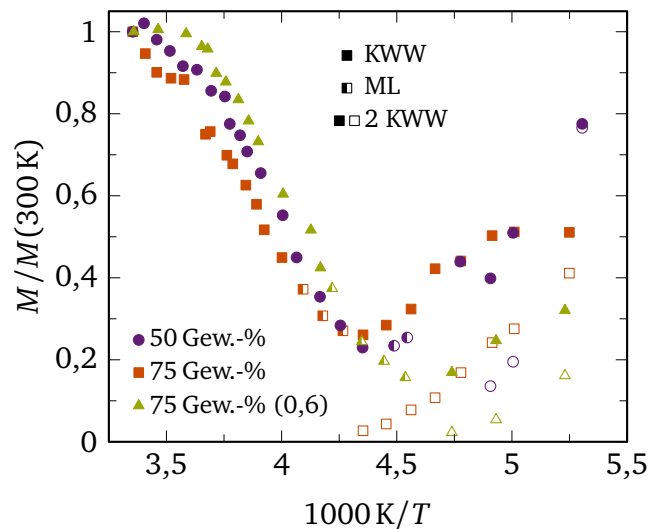


Bild 6.9: Temperaturabhängigkeit des Reduktionsfaktors M des Magnetisierungsaufbaus von Glycerin der Proteinsysteme.

schen 300 K und 210 K durchweg die langsamste Dynamik aufweist. Die T_1 -Minima der 50 Gew.-%-Mischung und 75 Gew.-% (0,6)-Mischung treten bei der gleichen Temperatur auf, das Minimum des Reduktionsfaktors des 50 Gew.-%-System liegt 17 K höher, woraus geschlossen werden kann, dass die Dynamik der 50 Gew.-%-Mischung die stärkere Temperaturabhängigkeit aufweist.

Linienform-
übergang

Der Linienformübergang erstreckt sich für das 50 Gew.-%-System von 241 K bis 216 K, für das 75 Gew.-%-System von 250 K bis 220 K und für das 75 Gew.-%-System mit höherem Solvationsgrad von 240 K bis 204 K. Die Reihenfolge, in der die Übergänge beobachtet werden, stimmt mit jener der Reduktionsfaktoren überein: Die höchste Temperatur und damit langsamste Dynamik weist das 75 Gew.-%-System auf, das System mit 50 Gew.-% Glycerin ist etwas schneller und die schnellste Dynamik wird bei höherem Solvationsgrad beobachtet.

In allen drei Fällen wird im entsprechenden Temperaturbereich eine Überlagerung aus Lorentzlinie (rote Linie) und Pakespektrum (schwarze Linie) beobachtet, wie am Beispiel der Spektren bei $T \approx 224$ K in Bild 6.10a zu sehen ist. Daraus folgt für diese Systeme, dass schnelle und langsame Beiträge der unterliegenden Verteilung bezüglich der Zeitskala der inversen Kopplungskonstanten koexistieren. Der relative Anteil der Lorentzlinie, der Gewichtungsfaktor $W(T)$, an der Signalintensität entspricht dem Anteil der Verteilung, dessen Korrelationszeiten kürzer als die inverse Kopplungskonstante $\delta^{-1} \approx 1,3 \mu\text{s}$ ist. Die Gewichtungsfaktoren der untersuchten Systeme sind zusammen mit denen von Elastin-Glycerin-Systeme¹⁴⁷ in Bild 6.10b aufgetragen.

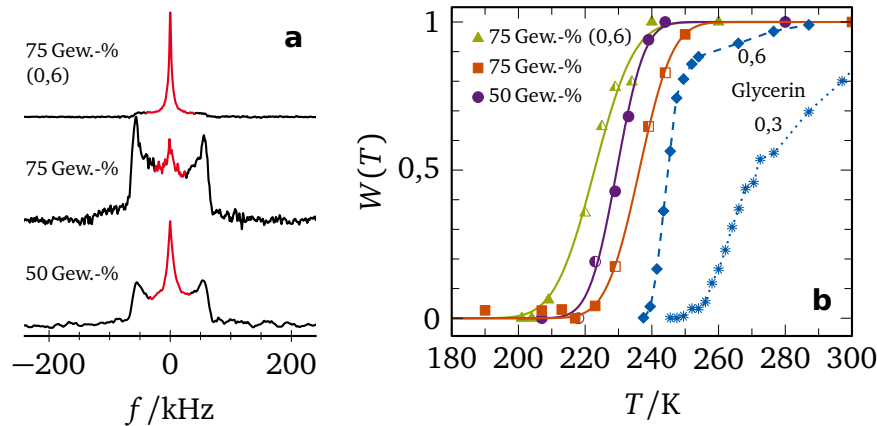


Bild 6.10: (a) ^2H -NMR-Spektren im Übergangsbereich bei $(224 \pm 1) \text{ K}$ der Systeme. Rot hervorgehoben ist der Anteil der Lorentzlinie am Gesamtspektrum, der $W(T)$ festlegt. (b) Gewichtungsfaktor $W(T)$ von Glycerin in den betrachteten Proteinsystemen im Vergleich mit Elastin-Glycerin-Systemen.¹⁴⁷ Durchgezogene Linien sind Anpassungen nach Gleichung (3.69).

Die Temperaturabhängigkeit des Gewichtungsfaktors der Mischsysteme lässt sich mit Gleichung (3.69) parametrisieren. Das unterscheidet die binären Lösungsmittel vom reinem Glycerin, das insbesondere für den niedrigeren Solvationsgrad ein deutliches Abknicken im Kurvenverlauf zeigt. Obwohl der Magnetisierungsaufbau im Tieftemperaturbereich zweistufig ist, scheint der Gewichtungsfaktor davon unbeeinflusst zu sein. Die halbgefüllten Symbole in Bild 6.10b kennzeichnen wie bereits in Bild 6.8 Temperaturen, bei denen die langsame Komponente sichtbar, aber so schwach ausgeprägt ist, dass eine Parametrisierung nicht möglich ist. Dieser Temperaturbereich endet für alle drei Systeme erst bei Temperaturen, bei denen der Linienformübergang bereits fast vollständig durchschritten wurde. Eine mögliche Erklärung wäre daher, dass der Einfluss der langsamen Komponente aufgrund des deutlich geringeren Signalbeitrags vom Linienformübergang der schnellen Komponente überdeckt wird. Da die Breite des Temperaturbereichs, in dem der Linienformübergang stattfindet, nicht nur von der Breite der unterliegenden Verteilung, sondern auch von der Temperaturabhängigkeit beeinflusst wird, lassen sich hieraus keine Schlüsse ziehen.

Unterhalb von $T = 210 \text{ K}$ wurden Stimulierte-Echo-Experimente für eine Evolutionszeit von $10 \mu\text{s}$ durchgeführt, um die Temperaturabhängigkeit der Glycerindynamik im Millisekundenbereich zu untersuchen. Die Zahl der freien Parameter konnte dadurch reduziert werden, dass beim verwendeten Zeeman-Experiment der Relaxationsbeitrag bereits durch Messung der Spin-Gitter-Relaxation bekannt ist. Der beobachtete Signalabfall wird nicht komplett durch die Spin-Gitter-Relaxation

Stimulierte
Echos

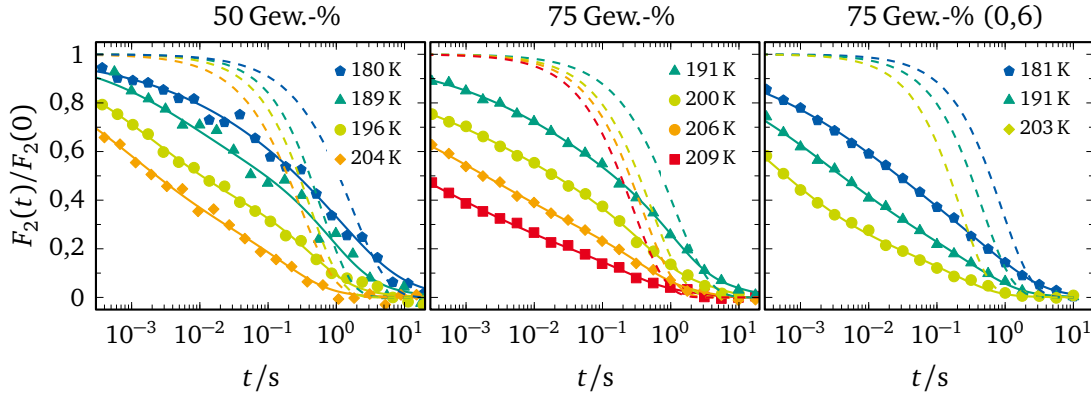


Bild 6.11: Abfallkurven des Stimulierten-Echo-Experiments der untersuchten Mischungssysteme, gestrichelte Linien stellen Abfällen durch Spin-Gitter-Relaxation der schnellen Glycerinkomponente dar.

der schnellen Glycerinkomponente (gestrichelte Linie in Bild 6.11) begrenzt, wie bei tiefen Temperaturen zu erkennen ist. Für diesen Beitrag der langsamen Glycerinkomponente wird die Annahme getroffen, dass deren Dynamik jenseits der experimentellen Zeitskala liegt und ausschließlich mit ihrer Spin-Gitter-Relaxation zerfällt. Gleichung (3.72) zur Beschreibung der Stimulierten-Echo-Experimentes wird daher zu

$$\frac{F_2(t)}{F_2(0)} = (1 - M) \left\{ (1 - F_\infty) \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_k} \right)^\beta \right] + F_\infty \right\} \exp \left[- \left(\frac{t}{T_{1,1}} \right)^{\beta_1^{\text{SGR}}} \right] + M \exp \left[- \left(\frac{t}{T_{1,2}} \right)^{\beta_2^{\text{SGR}}} \right] \quad (6.4)$$

erweitert, was in einer erfolgreichen Anpassung der Messkurven mündet. Bild 6.11 zeigt die Messkurven der drei Systeme mit den Anpassungen nach Gleichung (6.4). Der Korrelationsabfall ist stark gestreckt und für keinen der betrachteten Fälle vollständig im experimentellen Zeitfenster. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen von Protein-Wasser^{16,200} und Protein-Glycerin-Systemen¹⁴⁷ überein.

Die aus den Anpassungen gewonnenen Parameter sind in Bild 6.12 abgebildet. Die Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten ist für alle Systeme ähnlich. Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung und Erhöhung des Solvatationsgrads verändern nur die Absolutwerte der Zeitkonstanten. Die langsamste Dynamik wird für die 75 Gew.-%-Mischung, d. h. den höchsten Glycerinanteil und den niedrigsten Solvatationsgrad, beobachtet; Erniedrigung des Glycerinanteils oder Erhöhung

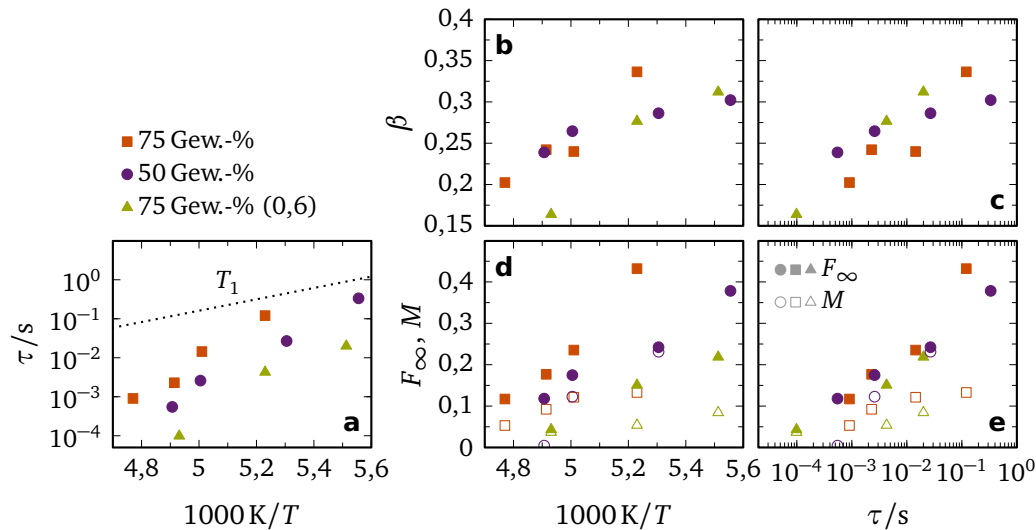


Bild 6.12: Parameter aus Anpassung der Stimulierten-Echo-Abfälle: Temperaturabhängigkeit von Korrelationszeit τ (a), Streckungsparameter β (b), Endplateau F_∞ (gefüllte Symbole) und langsame Komponente M (offene Symbole) (d); Bild (c, e): Streckungsparameter β und F_∞ sowie langsame Komponente M über die Korrelationszeiten. Gestrichelte Linie in (a) kennzeichnet die Relaxationszeiten der schnellen Komponente (vgl. Bild 6.8).

der Solvation führt zu einer Beschleunigung der Dynamik. Der Solvationsgrad hat dabei einen stärkeren Einfluss auf die Dynamik als die Solvenskomposition. Analog zum Befund aus der Untersuchung der Spin-Gitter-Relaxation (Bild 6.9) ist auch in den Stimulierten-Echo-Experimenten die Signalintensität M der langsamen Glycerinkomponente für die niedrigeren Solvationsgrade stärker ausgeprägt. Ein Vergleich der weiteren Parameter fällt einfacher, wenn statt der Temperaturabhängigkeit (Bild 6.12b,d) die Abhängigkeit von der Korrelationszeit betrachtet wird (Bild 6.12c,e). Sowohl das Endplateau F_∞ als auch der Streckungsparameter β sind im Rahmen der Ungenauigkeit unabhängig vom betrachteten System. Das Endplateau F_∞ nimmt mit langsamer werdender Dynamik um das Vierfache von 0,1 auf 0,4 zu. Der Streckungsparameter steigt ebenfalls mit langsamerer Dynamik von $\beta \approx 0,15$ auf $\beta \approx 0,3$. Der Anstieg dieser Parameter ist jedoch nicht zwingend eine Folge veränderter Dynamik, da die Zeitskala des Korrelationsabfalls auf die der Spin-Gitter-Relaxation trifft.

Die Effekte, die ein Überkreuzen von Korrelationszeitenverteilung und Spin-Gitter-Relaxationszeit hat, werden im Folgenden anhand der Beobachtungen in Random-Walk-Simulationen aufgezeigt. Zur Veranschaulichung wurden dafür Korrelationsabfälle eines isotropen Zufallssprungs bei Annahme einer Log-Gauß-Verteilung mit Verteilungsbreite $\sigma = 3$ für verschiedene Modalwerte τ_m berechnet und mit einem

Kreuzung von
Stimuliertem
Echo und
Relaxation

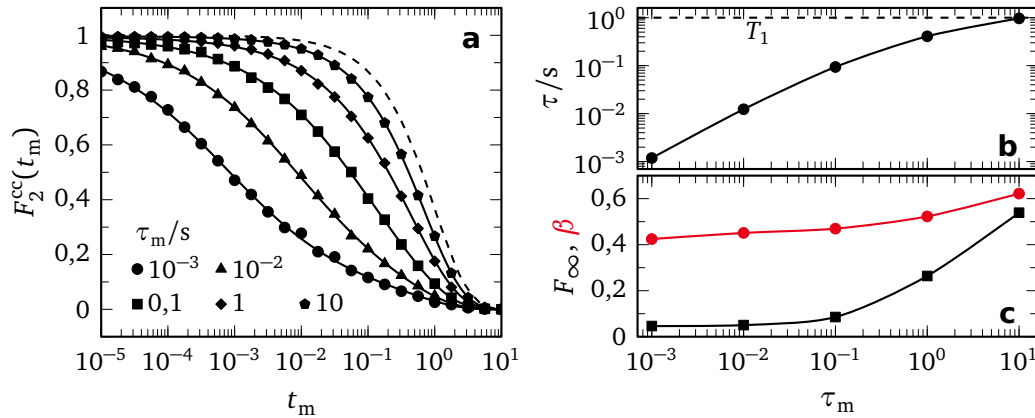


Bild 6.13: (a) Simulationen des Zeeman-Experiments ($t_{ev} = 10 \mu s$) eines isotropen Zufallssprungs mit Log-Gauß-Verteilung ($\sigma = 3$) mit zusätzlicher exponentieller Dämpfung (gestrichelte Linie). (b,c) Parameter bei Anpassung mit Gleichung (3.72).

exponentiellen Abfall $\exp[-(t_m/1s)^{0,85}]$ multipliziert. Die so entstandenen Kurven sind in Bild 6.13a abgebildet. Aufgrund der breiten Verteilung sind auch im Fall $\tau_m > T_1$ noch Reste der Korrelationsfunktion zu sehen. Die Anpassung der Kurven mit Gleichung (3.72) ergibt die in Bild 6.13b und Bild 6.13c dargestellten Parameter. Im Bereich $\tau_m \ll T_1$ (im Experiment bei hohen Temperaturen) sind die Werte unbeeinflusst von Relaxation und die resultierende Korrelationszeit entspricht dem Verteilungswert τ_m . Nähert sich der Wert von τ_m der Abfallzeit der Spin-Gitter-Relaxation (im Experiment durch Erniedrigung der Temperatur), werden für das Endplateau F_∞ und den Streckungsparameter β die gleichen Beobachtungen wie im Experiment in Bild 6.12b,d gemacht: Beide Größen steigen mit langsamer werdender Dynamik deutlich an. Zugleich ist die apparente Korrelationszeit τ kürzer als τ_m und nähert sich der Relaxationszeit T_1 an. Die Begrenzung durch Spin-Gitter-Relaxation führt bei breiten Verteilungen $G(\ln \tau)$ zu Korrelationsfunktionen, die den Eindruck erwecken, dass eine schmalere und schnellere Verteilung als die tatsächliche vorliegt. Nicht nur sehr lange Korrelationszeiten und der Einfluss der Spin-Gitter-Relaxation beeinträchtigen die Form der gemessenen Stimulierten-Echo-Kurven, sondern auch sehr kurze Zeiten, die auf der Zeitskala der Evolutionszeit liegen. Deren Auswirkungen wurden im Rahmen von Random-Walk-Simulationen bereits ausführlich untersucht.⁴¹⁰

Korrelations-
zeiten

Die Kombination der Korrelationszeiten der schnellen Glycerinkomponenten aus den verschiedenen Methoden ist in Bild 6.14a abgebildet. Die Temperaturabhängigkeit aller untersuchten Systeme folgt einem Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten. Lediglich die Korrelationszeiten bei den tiefsten betrachteten Temperaturen weisen scheinbar

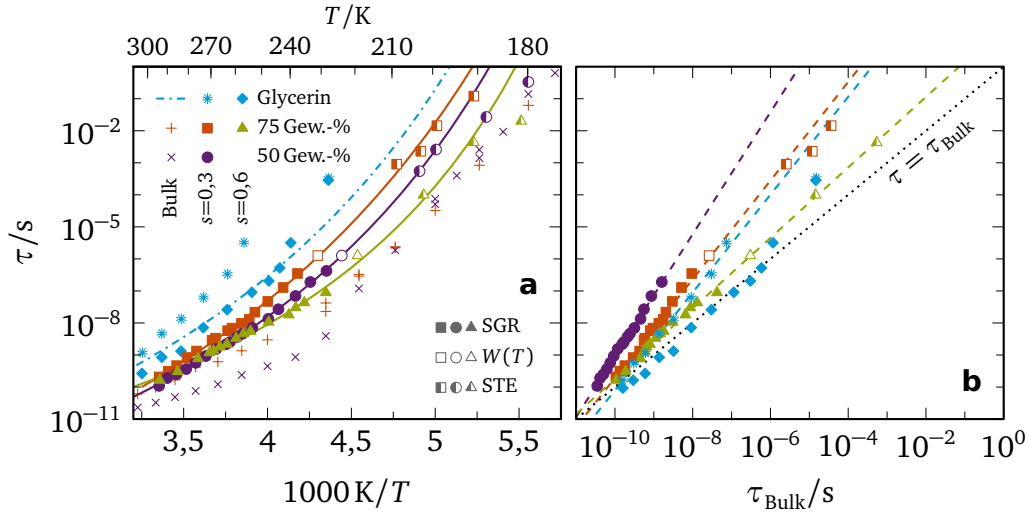


Bild 6.14: (a) Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten von Glycerin der untersuchten Wasser-Glycerin-Mischungen aus Spin-Gitter-Relaxation, Linienformübergang $W(T)$ und Stimuliertem Echo und von reinem Glycerin an Elastin.¹⁴⁷ Bulkdaten der Mischsysteme aus 2H -NMR-Experimenten und dielektrischer Spektroskopie.⁴⁰⁸ Bulkglycerin wird durch VFT-Funktion mit Parametern aus dielektrischer Spektroskopie dargestellt.⁵⁰ (b) Korrelationszeiten der Proteinsysteme in Abhängigkeit von Bulkkorrelationszeiten. Das 50 Gew.-%-System wird nur im Bereich ohne Kristallisation verglichen. Linien dienen zur Orientierung.

auf eine veränderte Temperaturabhängigkeit hin. Der vorhergehende Abschnitt legt jedoch nahe, dass diese Beobachtung auf den Einfluss der Spin-Gitter-Relaxation und nicht auf eine Änderung der Dynamik zurückzuführen ist (Bild 6.13b).

Bei einem Solvationsgrad von $s = 0,3$ wird die Glycerindynamik für die hier betrachteten Wasser-Glycerin-Mischungen und für reines Glycerin¹⁴⁷ im Temperaturbereich $T < 300$ K durch das Protein verlangsamt. Nicht nur die absolute Zeitskala der Glycerindynamik wird durch das Elastin beeinflusst, sondern auch deren Temperaturabhängigkeit. Alle drei gezeigten Systeme folgen den Korrelationszeiten der Bulksysteme im Hochtemperaturbereich näherungsweise mit einem Potenzgesetz $\tau \propto \tau_{Bulk}^a$ mit $a \approx 1,55 - 1,7$, wie anhand der Auftragung der Korrelationszeiten der Proteinsysteme über die der Bulksysteme in Bild 6.14b deutlich wird. Verknüpft mit dem Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten der Temperaturabhängigkeit folgt daraus eine geringere Fragilität der Dynamik an der Proteinoberfläche. Der Einfluss des Elastins auf die absolute Verlangsamung und die Temperaturabhängigkeit nimmt mit abnehmenden Glycerinanteil zu. Im Gegensatz zum deutlichen Einfluss des Elastins wurden für Glycerin an Collagen für diesen Solvationsgrad bulkähnli-

che Korrelationszeiten beobachtet.^{127,147} Für Protein-Wasser-Systeme wird hingegen keine Abhängigkeit der Korrelationszeiten von Wasser vom verwendeten Protein gefunden.¹⁶ Eine abschließende Antwort, die diese unterschiedlichen Beobachtung vereint, steht noch aus, mögliche Erklärungen können in der Kombination aus unterschiedlichen Molekülgröße, unterschiedlichen Proteinstrukturen und damit in der Proteinbeweglichkeit⁴¹¹ zu finden sein.

Bei einem höheren Solvatationsgrad von $s = 0,6$ folgen die Korrelationszeiten des Glycerins der Temperaturabhängigkeit des entsprechenden Bulksystems. Eine schwache Verlangsamung wird für das 75 Gew.-%-System beobachtet, reines Glycerin am Protein weist keine Verlangsamung auf. Dieser Befund stimmt mit anderen Untersuchung der Glycerindynamik an Proteinen überein.^{127,282,412,413} Die starke Abhängigkeit vom Solvatationsgrad deutet darauf hin, dass mit zunehmender Lösungsmittelmenge die Zahl an Glycerinmolekülen steigt, die aufgrund eines größeren Abstands weniger stark gebunden sind und durch die Proteinoberfläche beeinflusst werden.

Die unterliegende Verteilung der Korrelationszeiten wird im gesamten Temperaturbereich in allen betrachteten System durch das Elastin beeinflusst. In den Bulksystemen kann die Verteilung der Wasser-Glycerin- und Glycerin-Bulksysteme durch die Cole-Davidson-Funktion beschrieben werden,^{127,326} Die Ergebnisse aus den Stimulierten-Echo-Experimenten und Analyse der Spin-Gitter-Relaxation zeigen jedoch eine deutlich verbreiterte Verteilung an Korrelationszeiten für Protein-Lösungsmittel-Systeme. Dies lässt sich auf die bereits erwähnte Verlangsamung mit zunehmender Nähe zur Proteinoberfläche zurückführen.^{126,138,305,405}

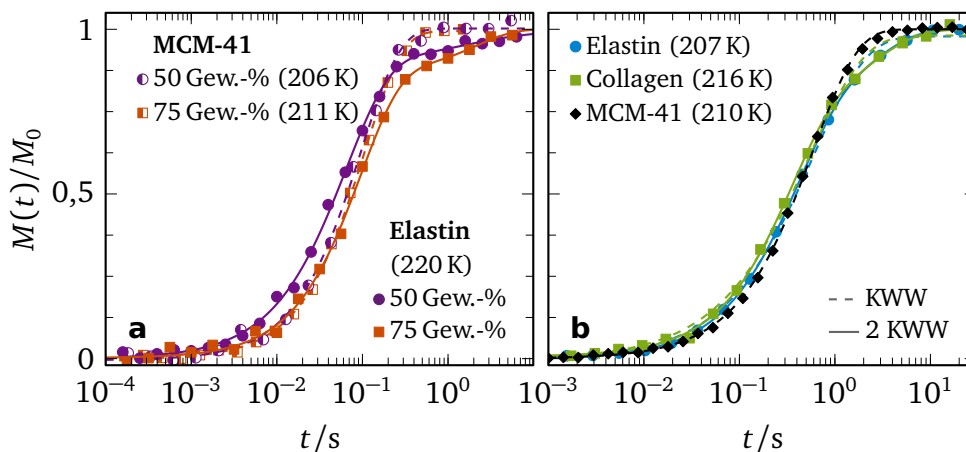


Bild 6.15: Vergleich des Magnetisierungsaufbaus von Glycerin in Abhängigkeit des Confinements. (a) Wasser-Glycerin-Mischungen in MCM-41 C14 ($d = 2,8 \text{ nm}$)⁴¹⁴ und an Elastin. (b) Glycerin- d_5 in MCM-41 C14⁴¹⁵ und an den Proteinen Elastin bzw. Collagen.⁴¹⁶

Eine zweite langsamere Lösungsmittelkomponente wurde bisher in ^2H -NMR-Untersuchungen von wasserstoffbrückenbildenden Systemen in Silikaporen beobachtet.^{240,409} In diesen Fällen kann sie auf eine verfestigte Komponente im Poreninnern zurückgeführt werden, da die dort betrachteten Lösungsmittel als Bulksysteme zur Kristallisation neigen. Eine genauere Betrachtung des Magnetisierungsaufbaus von Protein-Glycerin-Systemen⁴¹⁶ zeigt im Tieftemperaturbereich ebenfalls einen zweistufigen Aufbau (Bild 6.15b). Für reines Glycerin und Glycerin in Wasser-Glycerin-Mischungen in Silikaporen wird eine zweite festkörperartige Komponente nicht beobachtet (Bild 6.15). Die Interpretation der langsamen Stufe als kristalline Komponente ist daher als unwahrscheinlich zu erachten.

Langsame
Glycerinkompo-
nente

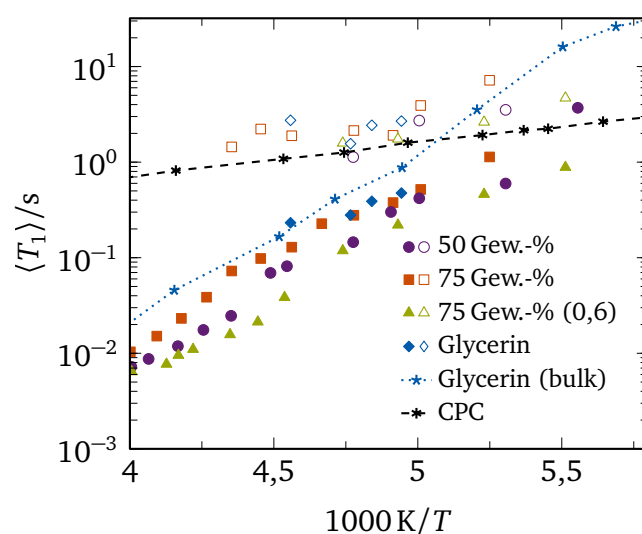


Bild 6.16: Spin-Gitter-Relaxationszeiten von Glycerin der Wasser-Glycerin-Systeme aus Bild 6.8 und Elastin-Glycerin⁴¹⁶ im Vergleich mit den Werten trockenen c-Phycocyanins (CPC)¹⁴⁵ und Bulkglycerin.⁴¹⁷

Eine Unterscheidung in Glycerinmoleküle an der Proteinoberfläche und Moleküle im Proteininnern ist ein Erklärungsansatz, der die Situation beschreiben kann. Aus der Untersuchung hydratisierter Proteine ist bekannt, dass Wassermoleküle sich im Proteininnern aufhalten können und Dynamik auf der Zeitskala des Proteins zeigen.^{153,411,418} Der Befund, dass die langsame Komponente bei hohem Glycerinanteil und niedrigem Solvatationsgrad am ausgeprägtesten ist, kann durch die Aufteilung in Moleküle im Proteininneren und an der Proteinoberfläche erklärt werden: Je höher der Glycerinanteil an der Lösungsmittelzusammensetzung ist, umso wahrscheinlicher ist der Aufenthalt im Innern; je geringer der Solvatationsgrad, umso höher ist der relative Anteil dieser Moleküle. Ein weiterer Hinweis darauf, dass dies auch für Glycerin der Fall sein könnte, liegt im Vergleich der Relaxationszeiten des Glycerins mit denen von trockenem c-Phycocyanin¹⁴⁵ in Bild 6.16. Sowohl die

Werte des Glycerins als auch des Proteins zeigen in der Temperaturabhängigkeit und in der absoluten Zeitskala ein ähnliches Verhalten, was möglicherweise auf einen Zusammenhang zwischen Zeitskala der Proteindynamik und der langsamen Glycerindynamik hindeutet.

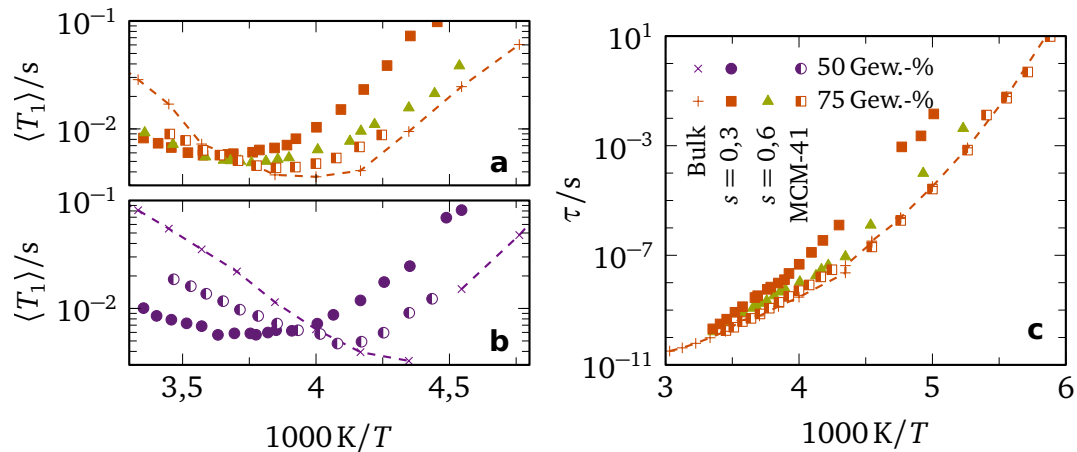


Bild 6.17: Einfluss unterschiedlicher Grenzflächen auf die Glycerindynamik: (a, b) Spin-Gitter-Relaxationszeiten des Glycerins für Wasser-Glycerin-Mischungen als Bulksystem, in MCM-41 C14 ($d = 2,8 \text{ nm}$)⁴⁰⁹ und in Elastin. (c) Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten des 75 Gew.-%-Systems.

Vergleich mit
dem Einfluss
harten
Confinements

In der Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxation (Bild 6.17a) wird auch in Silikaporen eine Kristallisation unterdrückt. Wie auch für die Elastinsysteme ist der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Dynamik verringert. Höhere Minimawerten zeigen eine breitere Verteilung der Korrelationszeiten an. Der Einfluss des Proteins auf die Dynamik ist aber für beide Systeme ausgeprägter als der des harten Confinements. Die Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten in Bild 6.17b für die verschiedenen 75 Gew.-%-Mischungssysteme verstärkt diese Beobachtung. Die Korrelationszeiten des Glycerins im Bulksystem und im harten Confinement sind nahezu identisch, im Proteinsystem ist die bereits diskutierte starke Verlangsamung mit geringerem Solvatationsgrad zu sehen. Auch für diesen Vergleich spielt der Abstand der Glycerinmoleküle zur Grenzfläche eine Rolle: Für geringere Solvatationsgrade ist ein großer Anteil des Glycerins in direktem Kontakt mit dem Protein und entsprechend durch diese beeinflusst. Bei hohem Solvatationsgrad und in Silikaporen wird die beobachtete Korrelationszeit durch Moleküle mit größerem Abstand zur Porenwand bzw. zur Proteinoberfläche bestimmt.

6.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel am Beispiel von Elastin und reinem Glycerin bzw. Wasser-Glycerin-Mischungen genauer betrachtet.

Die Untersuchung der Elastindynamik mittels ^{13}C -NMR-Spektren ergab, dass für reines Glycerin als Solvens kleinamplitudige Fluktuationen bei Raumtemperatur ab einem Solvatationsgrad $s \approx 0,3$ und großamplitudige Proteinfluktuationen ab $s \approx 0,6$ aktiviert sind. Diese Beobachtungen lassen sich mit dem Slaving-Modell in Einklang bringen: Kleinamplitudige Fluktuationen stellen eine gekoppelte Bewegung von Lösungsmittel und Protein dar, großamplitudige Fluktuationen sind hingegen auf die Existenz von Bulklösungsmittel angewiesen.^{18,45}

^{13}C -NMR-Spektren von Elastin in Wasser-Glycerin-Mischung zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Lösungsmittels. Ein steigender Glycerinanteil und daraus folgende steigende Viskosität führte zu einer Verringerung der Elastinmobilität. Aus der Temperaturabhängigkeit der Spektren konnte geschlossen werden, dass Elastindynamik unterhalb einer Temperatur von 245 K für alle verwendeten Lösungsmittel langsamer als $\tau \approx 10^{-5}$ s ist.

Die Glycerindynamik in Wasser-Glycerin-Mischungen wurde mit Hilfe von verschiedenen ^2H -NMR-Methoden untersucht. An Elastin ist der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung bei gleichbleibendem Solvatationsgrad im Vergleich zu den Bulksystemen reduziert. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen am Elastin-Glycerin-System¹⁴⁷ ist die Dynamik bei Solvatationsgraden, die nicht zu einer Aktivierung großamplitudiger Proteinfluktuationen ausreichen, stark verlangsamt und zeigt eine weniger fragile Temperaturabhängigkeit. Bei Erhöhung des Solvatationsgrads auf $s = 0,6$, für den großamplitudige Proteinfluktuationen beobachtet werden können, sind die Korrelationszeiten den Werten des Bulksystems ähnlich. Die unterliegenden Korrelationszeitenverteilungen weisen für alle untersuchten Solvatationsgrade und Lösungsmittelzusammensetzungen eine größere Verteilungsbreite auf.

In den Ergebnissen der ^2H -NMR-Experimente trat zudem eine zweite langsame Glycerinkomponente auf. Deren Temperaturabhängigkeit sowie die Entwicklung des Glycerinsignal in ^{13}C -NMR-Spektren deuten darauf hin, dass die Dynamik eines Teils der Glycerinmoleküle auf der Zeitskala der Proteindynamik stattfindet und eng mit dieser gekoppelt ist.

Einige der Befunde, z. B. das Einsetzen von Elastinbewegung, lassen sich im Rahmen des Slaving-Modells für hydratisierte Proteine von Frauenfelder et al. erklären. Die Erhöhung der Verteilungsbreite der Lösungsmitteldynamik oder die starke

Abhängigkeit der Glycerindynamik vom Solvatationsgrad sind Punkte, die durch dieses Modell jedoch nicht beschrieben werden können. Anstelle der einseitigen Beeinflussung des Proteins durch das Lösungsmittel, die durch das Slaving-Modell vorgeschlagen wird, ist für ein vollständiges Verständnis der Wechselwirkungen die wechselseitige Einflussnahme zwischen den Komponenten zu berücksichtigen.
20,164,186

7 DYNAMIK VON LYSOZYM/WASSER-DMSO

In den vorherigen Kapiteln wurde mit Elastin ein Protein verwendet, das auch im hydratisierten Zustand eine Glasübergangstemperatur T_g oberhalb von Raumtemperatur besitzt. Dies hatte zur Folge, dass Dynamik in einem Temperaturbereich untersucht wurde, in dem sich das Elastin im Glaszustand befindet. Im Folgenden wird hingegen als Protein Lysozym verwendet, das bei einem Hydratationsgrad von $h = 0,3$, für den Proteindynamik beobachtet werden kann, eine Glasübergangstemperatur von $T_g \approx 150\text{ K} - 160\text{ K}$ hat^{28,419} (vgl. Bild 4.1). Somit kann für einen großen Teil des betrachteten Temperaturbereichs Dynamik oberhalb des Glasübergangs detektiert werden.

Tabelle 7.1: Mischungsverhältnisse und Solvatationsgrad s der untersuchten Wasser-DMSO-Mischungen, Probenbezeichnungen beziehen sich auf den Anteil des Wassers in Molprozent. Die Farben werden in den folgenden Abbildungen zur Unterscheidung der Systeme verwendet.

Bezeichnung	Verhältnis Wasser : Kosolvens		Solvatationsgrad s
	Mol	Masse	
33 Mol-%	33 : 67	68 : 32	0,68
66 Mol-%	66 : 34	89 : 11	0,97

Um die Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel zu untersuchen, wird die binäre Mischung Wasser-Dimethylsulfoxid (DMSO) sowohl im eutektischen Mischungsverhältnis $2\text{ mol}_{\text{H}_2\text{O}} : 1\text{ mol}_{\text{DMSO}}$ und mit einem Wasseranteil von 33 Mol-% untersucht. Einflüsse auf die Dynamik durch mögliche Strukturänderungen³⁴⁶ können für das zweite Mischungsverhältnis auftreten und müssen daher bei der Interpretation der Messdaten in Betracht gezogen werden.

Anders als bei der Untersuchung der Wasser-Glycerin-Systeme, die bei einem konstanten Solvatationsgrad durchgeführt wurde, wurde für die Lysozym-Wasser-DMSO-Systeme eine konstante Lösungsmittelkonzentration von 1,6 Molekülen pro Aminosäure gewählt. Diese Konzentration entspricht einem Hydratationsgrad von $h = 0,3$ eines Lysozym-Wasser-Systems, sodass von Aktivierung der Proteindynamik ausgegangen werden kann.

Die Untersuchung der Dynamik erfolgt mittels dielektrischer und NMR-Spektroskopie.* Die Kombination beider Methoden wurde bereits häufiger zur Charakterisierung komplexer Systeme angewendet,^{37–39,94,422} inklusive der 66 Mol-%-Mischung des

* Messungen an diesen Systemen wurden im Rahmen der Bachelorarbeiten von Hopfenmüller⁴²⁰ und Schoner⁴²¹ durchgeführt.

Wasser-DMSO-Systemen.³³⁸ Diese Kombination ermöglicht sowohl einen Überblick über die Gesamtdynamik in einem großen Temperatur- und Zeitbereich mittels dielektrischer Spektroskopie als auch Einblicke in die Dynamik der einzelnen Komponenten mittels NMR-Experimenten.

7.1 Differenzkalorimetrie an Lysozym-Wasser-DMSO

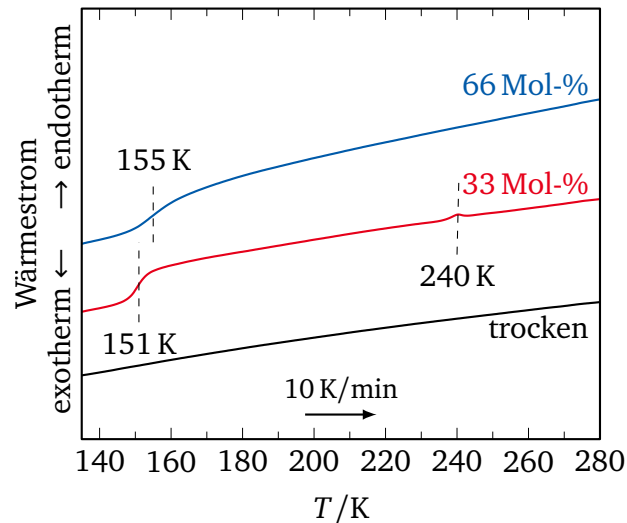


Bild 7.1: Thermogramm von trockenem Lysozym und Lysozym-DMSO-Wasser-Systemen bei einer Heizrate von 10 K/min. Die Messkurven wurden zur besseren Darstellung vertikal verschoben. Gestrichelte Linien kennzeichnen die Wendepunkte der Glasübergangsstufen und das Maximum der Kristallisation.

Vor der Diskussion der Dynamik in den nächsten Abschnitten wird zunächst der Einfluss der Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel auf Kristallisation und Glasübergang betrachtet. Dafür wurden Differenzkalorimetrie-(DSC-)Messungen an trockenem Lysozym sowie an der 33 Mol-%- und 66 Mol-%-Probe durchgeführt. Bild 7.1 zeigt den Wärmestrom der drei Proben bei einer Heizrate von 10 K/min im Temperaturbereich von 135 K bis 280 K. Wie bereits in anderen Untersuchungen zum Glasübergang in Proteinsystemen^{28,119,120,419} weist auch hier das trockene Protein keine Anzeichen eines Glas- oder Phasenübergangs auf. Im Gegensatz zum trockenen Lysozym zeigen die Lysozym-Lösungsmittel-Systeme einen Glasübergang. Der Wendepunkt der Glasübergangsstufe befindet sich für die 33 Mol-%-Probe bei $T_g = 151$ K, für die 66 Mol-%-Probe bei $T_g = 155$ K. Die Temperaturspanne der 33 Mol-%-Probe, innerhalb derer der Glasübergang beobachtet wird, ist mit $\Delta T = 7$ K deutlich kleiner als die der 66 Mol-%-Probe mit $\Delta T = 15$ K. Die Breite des Glasübergangs des 66 Mol-%-Systems ist vergleichbar zu Befunden aus DSC-Untersuchungen an anderen Protein-Lösungsmittel-Mischungen.^{131,333} Zusätzlich

ist in der 33 Mol-%-Probe ein schwach ausgeprägter Schmelzpeak bei $T_m = 240$ K. Für dieses Mischungsverhältnis lässt sich die Bulk Mischung nicht unterkühlen, sondern kristallisiert bei $T = 270$ K,⁴²³ während dies für die 66 Mol-%-Mischung mit einem Glasübergang bei $T_g = 147$ K möglich ist. Wie bereits für die Wasser-Glycerin-Mischungen beobachtet wurde, lässt sich an der Proteinoberfläche eine Kristallisationswahrscheinlichkeit des Lösungsmittels reduzieren. Durch die Kristallisation des Bulksystems lässt sich für die Wasser-DMSO-Systeme keine Aussage darüber treffen, ob die Abhängigkeit der Lösungsmitteldynamik vom Mischungsverhältnis durch das Protein beeinflusst wird.

7.2 Dielektrische Spektroskopie an Lysozym/Wasser-DMSO

Um den Einfluss des Lösungsmittels zu verstehen, wurde neben den Protein-Lösungsmittel-Systemen auch trockenes Lysozym mittels dielektrischer Spektroskopie vermessen. Die Spektren im betrachteten Temperaturbereich von 130 K bis 300 K sind in Bild 7.2 dargestellt. Es sind zwei Prozesse deutlich zu erkennen: Prozess I ist ab etwa 200 K zu beobachten, das Maximum seines dielektrischen Verlustes schiebt aber erst in der Nähe von Raumtemperatur in den experimentell zugänglichen Bereich. Das Zentrum des kleineren Prozesses II durchquert zwischen 170 K und 270 K das experimentelle Zeitfenster. Dynamische Prozesse können auch in nominell trockenem Protein auftreten, da selbst nach Trocknung noch etwa 7 % strukturell gebundene Wassermoleküle vorhanden sind.¹⁸⁷ Beide Prozesse wurden auch von Panagopoulou et al. beobachtet.²⁸ Folgt man deren Zuordnung, lässt sich Prozess II auf die Relaxation polarer Seitengruppen zurückführen, während Prozess I der strukturellen Relaxation des Systems entspricht. Unterhalb von 180 K ist bei höheren Frequenzen ein Abfallen der Signalamplitude von $\varepsilon''(\omega)$ mit $\omega^{-\delta}$ zu beobachten. Ein solcher Hochfrequenzflügel wird häufig in glasbildenden Systemen gefunden.^{25,51,94,155,220}

Trockenes
Lysozym

Oberhalb von 190 K lässt sich die komplexe Permittivität $\varepsilon^*(\omega)$ über den gesamten Temperaturbereich mit

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \sum_{i=I,II} \frac{\Delta\varepsilon_i}{1 + (i\omega\tau_i)^{\alpha_i}} + \frac{\sigma_{DC}}{i\omega\varepsilon_0} \quad (7.1)$$

als Überlagerung von zwei Cole-Cole-Prozessen für Prozesse I und II und dem Beitrag der Gleichstromleitfähigkeit modellieren. Als Beispiel dafür wird in Bild 7.3a die Anpassung der Daten bei $T = 250$ K gezeigt. Im Tieftemperaturbereich $T \leq 190$ K muss für eine erfolgreiche Anpassung der Messdaten der Abfall der Hochfrequenzflanke berücksichtigt werden. Als Modellfunktion der Tieftemperaturspektren wurde

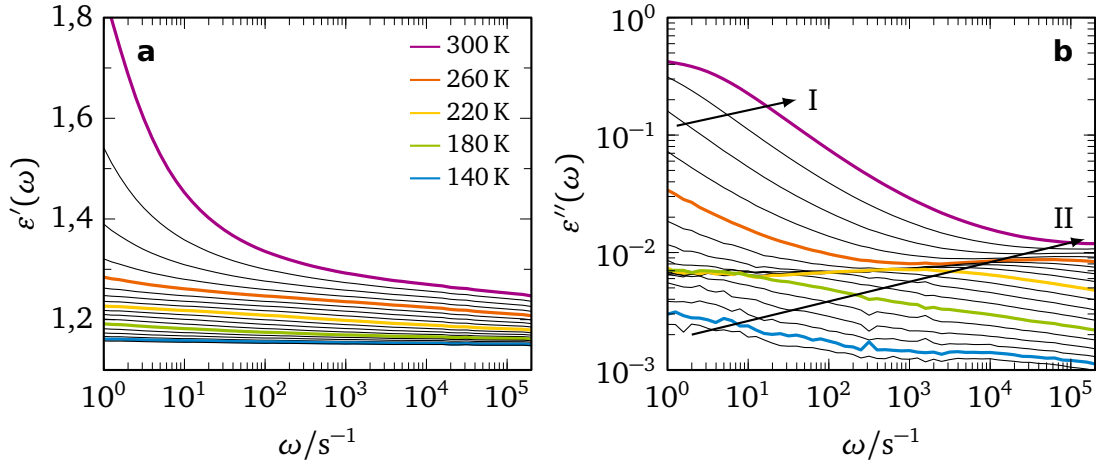


Bild 7.2: Dielektrische Permittivität $\varepsilon^*(\omega)$ von trockenem Lysozym zwischen 130 K und 300 K. Die Temperaturdifferenz zwischen den Messungen beträgt 10 K, farbige Kurven dienen der Orientierung.

mit

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{\Delta\varepsilon(1 + i\omega\tau_k)^{\alpha_{II}-\delta}}{1 + (i\omega\tau_{II})^{\alpha_{II}}} \quad (7.2)$$

eine Variante der Funktion von Blochowicz et al.⁹⁴ verwendet. Die Zeitkonstante τ_{II} kennzeichnet die Maximumsposition der Cole-Cole-Funktion, τ_k den Übergang von der Cole-Cole-Funktion zum Hochfrequenzflügel. Die Anpassung mit diesem Modell ist in Bild 7.3b für den dielektrischen Verlust bei $T = 180$ K zu sehen. Bei den niedrigsten Temperaturen, wenn auch das Maximum von Prozess II außerhalb des zugänglichen Frequenzbereichs liegt, wurde die Steigung der Frequenzabhängigkeit direkt abgelesen.

Die aus der Anpassung der Daten gewonnenen Parameter sind in Bild 7.4 aufgetragen. Prozess I wird nur bei wenigen Temperaturen beobachtet, was eine ausführliche Diskussion des Prozesses erschwert. Extrapoliert man den Trend der Korrelationszeiten, weist Prozess I bei $T \approx 280$ K eine Korrelationszeit von etwa 100 s auf. Diese Temperatur stimmt mit der von Panagopoulou et al. berichteten Glasübergangstemperatur überein.²⁸

Die Temperaturabhängigkeit von Prozess II folgt im Rahmen der Ungenauigkeit einem Arrhenius-Verhalten mit einer Aktivierungsenergie von $E_A \approx 0,65$ eV. Die aus quasielastischer Neutronenstreuung gewonnen Korrelationszeiten¹⁵⁴ zeigen eine ähnliche Temperaturabhängigkeit, sind jedoch ungefähr eine Größenordnung langsamer als die Zeiten der hier durchgeführten Messungen. Alleine mit dem Fehler durch die Anpassung lässt sich die Diskrepanz zwischen den Methoden nicht

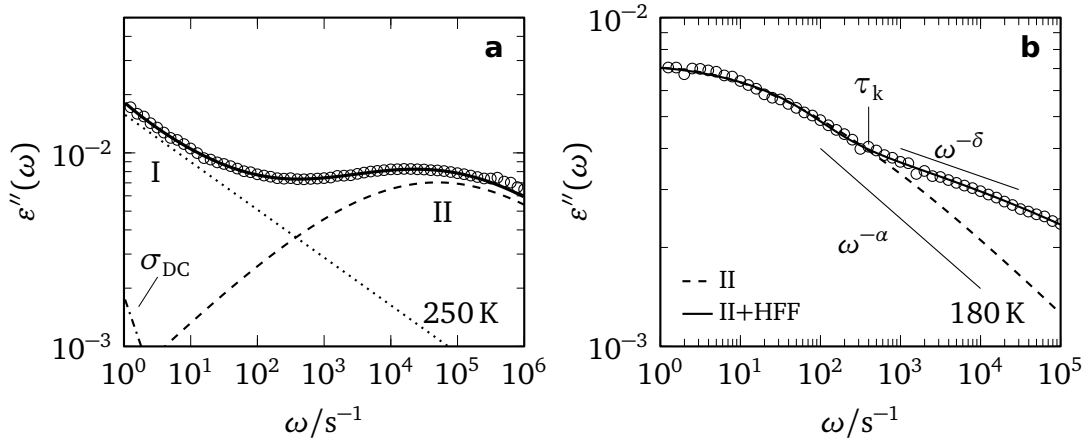


Bild 7.3: (a) Anpassung des dielektrischen Verlusts $\varepsilon''(\omega)$ von trockenem Lysozym bei 250 K mit Gleichung (7.1). Linien stellen die Beiträge von Prozess I, Prozess II und Gleichstromleitfähigkeit dar. (b) Anpassung bei 180 K nur mit Beitrag von Prozess II (Gleichung (3.18a)) und unter Berücksichtigung des Hochfrequenzflügels nach Gleichung (7.2).

erklären. Als mögliche Ursache sind aber unterschiedliche Hydratationsgrade des nominell trockenen Proteins in Betracht zu ziehen.

Die dielektrische Stärke $\Delta\varepsilon$ von Prozess II zeigt eine lineare Abhängigkeit $\Delta\varepsilon \sim T^{-1}$, wie nach Gleichung (3.109) zu erwarten ist. Unterhalb von $T = 210\text{ K}$ ist weiterhin eine Proportionalität zur inversen Temperatur mit einer schwächeren Steigung zu beobachten. Die Steigungsänderung setzt zusammen mit dem Auftreten des Hochfrequenzflügels ein. Eine Änderung der dielektrischen Stärke kann durch eine Änderung des effektiven Dipolmoments verursacht werden. In Lysozym in wässrigen Lösungen wurden solche Änderungen mit Konformationsänderungen⁹ bzw. mit Populationsumverteilungen zwischen energetischen Zuständen⁴²⁴ erklärt. Da die Änderung mit dem Auftreten des Hochfrequenzflügels zusammenfällt, kann aber auch eine Abspaltung des Hochfrequenzflügels von Prozess II eine mögliche Erklärung sein.

Der Breitenparameter α von Prozess II hat bei der höchsten beobachteten Temperatur einen Wert von $\alpha = 0,47$ und nimmt mit sinkender Temperatur kontinuierlich ab, um sich im Tieftemperaturbereich einem Plateauwert von 0,1 zu nähern. Bei $T \approx 180\text{ K}$ nimmt die Temperaturabhängigkeit des Breitenparameters ab. Die Änderung der Temperaturabhängigkeit fällt auch hier mit dem Auftreten des Hochfrequenzflügels zusammen. Die zunehmende Breite von Prozess II weist darauf hin, dass die unterliegende Verteilung von Korrelationszeiten auf eine Verteilung von Aktivierungsenergien zurückzuführen ist.

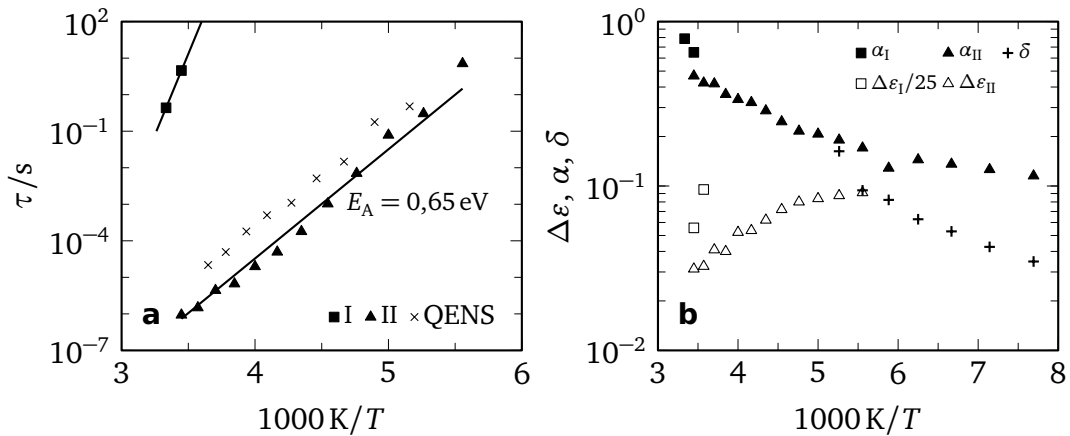


Bild 7.4: (a) Korrelationszeiten in trockenem Lysozym mit Literaturdaten von trockenem Lysozym ($h = 0,05$) aus quasielastischer Neutronenstreuung (QENS).¹⁵⁴ Linien sind Anpassung einer Arrhenius-Funktion an Prozess I bzw. II. (b) Dielektrische Stärke und Breitenparameter α und δ . Die dielektrische Stärke von Prozess I wurde zur besseren Darstellung durch den Faktor 25 geteilt.

Prozess II, der möglicherweise mit Seitengruppendynamik verbunden ist, legt aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten und der Verteilungsbreite eine Interpretation als Sekundärrelaxation des Proteins nahe. Es ist anzunehmen, dass sich bei $T = 210 \text{ K}$ der Hochfrequenzflügel von Prozess II abspaltet und die Temperaturabhängigkeit von Verteilungsbreite und dielektrischer Stärke verändert. Das Auftreten eines Hochfrequenzflügels wird in glasbildenden Systemen beobachtet.^{50,92,291,425} In diesen Systemen spaltet der Hochfrequenzflügel vom α -Prozess ab, was der Interpretation von Prozess II als Sekundärrelaxation widerspricht. Da in den DSC-Messungen kein Glasübergang beobachtet werden konnte und somit eine Zuordnung des α -Prozesses fehlt, lässt sich dieser Widerspruch anhand der vorhandenen Daten nicht auflösen.

Lysozym in
Wasser/DMSO

Nach der Charakterisierung des trockenen Lysozyms folgt nun die der Lysozym-Lösungsmittel-Systeme. Ein Vergleich mit der Dynamik des trockenen Proteins sowie des Bulklösungsmittels erlaubt Einblicke in die Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und Protein.

Die dielektrische Permittivität der 66 Mol-%-Probe bei $T = 190 \text{ K}$ in Bild 7.5 gibt einen Überblick über die Signalbeiträge der Lysozym-Lösungsmittel-Systeme. Die deutlich veränderte Form des Spektrums im Vergleich zum trockenen Lysozym lässt darauf schließen, dass die gewählten Solvatationsgrade zur Aktivierung der Proteindynamik ausreichen. Im dielektrischen Verlust $\epsilon''(\omega)$ dominiert ein großer Gleichstromleitfähigkeitsbeitrag, lediglich bei $\omega = 10^6 \text{ s}^{-1}$ kann ein Relaxations-

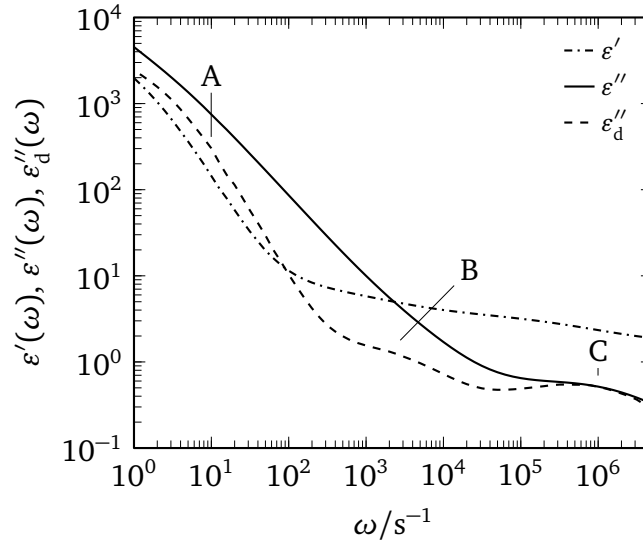


Bild 7.5: Komplexe Permittivität $\varepsilon^*(\omega)$ und leitfähigkeitskorrigierter Verlust $\varepsilon_d''(\omega)$ der 66 Mol-%-Probe bei 190 K.

prozess eindeutig zugeordnet werden. Eine hohe Gleichstromleitfähigkeit wurde in Untersuchungen von Protein-Lösungsmittel-Systemen mit dielektrischer Spektroskopie beobachtet und mit Ladungstransport durch Protonensprünge entlang des Wasserstoffbrückennetzwerkes der Hydrathülle erklärt.^{426–429} Die einzelnen Signale sind deutlicher zu erkennen, wenn man nach Gleichung (3.120) den leitfähigkeitskorrigierten Verlust ε_d'' berechnet. In dieser Darstellung lassen nun drei Signalbeiträge an den Positionen $\omega = 1 \text{ s}^{-1}$, $5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ und 10^6 s^{-1} feststellen, die nach der Reihenfolge ihres Auftretens als Prozess A, B und C bezeichnet werden.

Bild 7.6 zeigt die Frequenzabhängigkeit der komplexen Permittivität $\varepsilon^*(\omega)$ und der Ableitung $\varepsilon_d''(\omega)$ beider Proben im untersuchten Temperaturbereich von 140 K bis 300 K sowie der Leitfähigkeit $\sigma'(\omega) = \omega \varepsilon_0 \varepsilon''(\omega)$ im Temperaturbereich von 180 K bis 300 K. Beide Mischungsverhältnisse weisen im gesamten betrachteten Temperaturbereich ein qualitativ ähnliches Verhalten auf. Die drei bei 190 K gefundenen Prozesse durchlaufen das experimentelle Zeitfenster ohne offensichtliche Änderung der spektralen Form mit Änderung der Temperatur. Unterhalb von 180 K bildet sich wie auch im trockenen Protein ein Hochfrequenzflügel aus, dessen Steigung mit sinkender Temperatur abnimmt. Auf eine mögliche Ursache wird in der Diskussion der NMR-Daten näher eingegangen. In einigen Untersuchungen, beispielsweise von Wasser an Myoglobin³³³ oder Wasser in Ton,⁴³⁰ wird in diesem Temperaturbereich ein weiterer Prozess bei etwa $\omega \approx 10^5 \text{ s}^{-1}$ beobachtet. Ein solcher Prozess, der als Entkopplung eines schnellen Wasserprozesses vom Hauptprozess interpretiert wurde,⁴³¹ ist in beiden Proben nicht zu sehen. Oberhalb von $T = 200 \text{ K}$ tritt bei

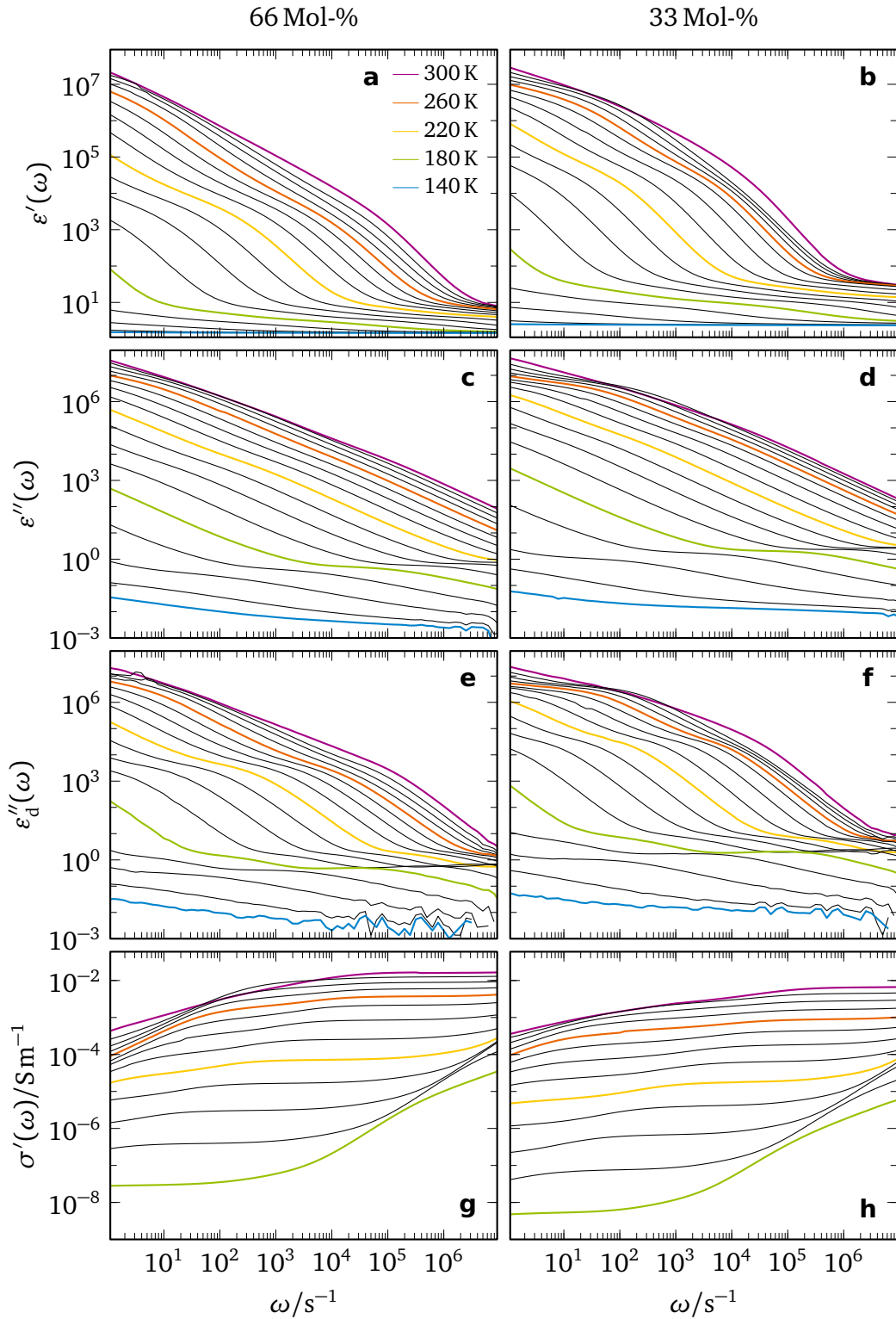


Bild 7.6: Komplexe Permittivität $\varepsilon^*(\omega)$ und Ableitung $\varepsilon''_d(\omega)$ der 66 Mol-%- (a, c, e) und der 33 Mol-%-Probe (b, d, f) zwischen 140 K und 300 K in Schritten von 10 K, Leitfähigkeit $\sigma'(\omega)$ im Temperaturbereich von 180 K bis 300 K (g, h). Farblich hervorgehobene Kurven dienen der Orientierung.

niedrigen Frequenzen ein zusätzlicher Signalbeitrag in das Messfenster. Dieser Beitrag weist auf das Auftreten von Elektrodenpolarisation (EP) hin.^{207,432} Nichtlineare Effekte, die als Folge von Elektrodenpolarisation auftreten können, können für beide Systeme ausgeschlossen werden, wie in Abschnitt C.1 ausgeführt wird.

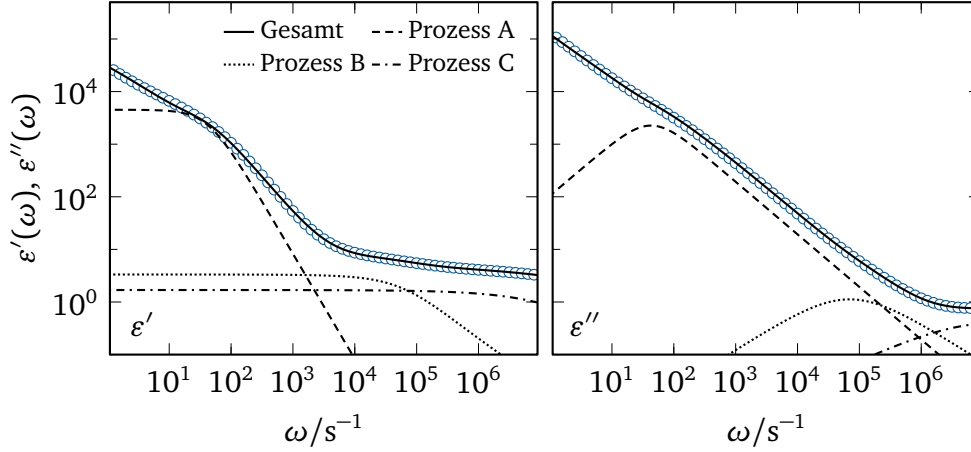


Bild 7.7: Anpassung der 66 Mol.-%-Probe bei $T = 210$ K mit Gleichung (7.7).

Unterhalb von $T = 200$ K ist eine Berücksichtigung der Elektrodenpolarisation nicht notwendig und eine Superposition der Relaxationsprozesse und der Gleichstromleitfähigkeit beschreibt die Messdaten. Wie es auch für das trockene Protein der Fall war, wird zur Berücksichtigung des Hochfrequenzflügels der Lösungsmittelprozesse anstelle einer Cole-Cole-Funktion Gleichung (7.2) verwendet. Da die Reduktion von Elektrodenpolarisation für biologische Systeme in der Literatur kritisch diskutiert wird (vgl. Abschnitt 3.6), wird stattdessen eine Berücksichtigung in der Modellierung vorgenommen. Der für alle Temperaturen zufriedenstellendste Ansatz zu Beschreibung der Daten wird im Folgenden dargestellt. Die Modellierung der Elektrodenpolarisation mittels eines Äquivalenzschwingkreises, der in Serie mit den Relaxationsbeiträgen des Systems geschaltet ist,^{433,434} passt die Messdaten sehr gut an. Bei Verwendung eines Äquivalenzschwingkreises ist die beobachtete Permittivität nach Gleichung (3.117) durch

Modellierung der Daten

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{1}{i\omega C_0 [Z_{EP}^*(\omega) + Z_S^*(\omega)]} \quad (7.3)$$

mit dem komplexen Widerstand Z_{EP}^* der Elektrodenpolarisation und Z_S^* durch die Relaxationsprozesse der Probe gegeben. Als Widerstand Z_{EP}^* finden sich in der Literatur das „Constant Phase Element“ (CPE)^{434,435} mit

$$Z_{EP}^*(\omega) = K(i\omega)^{-a} \quad (7.4)$$

oder die Havriliak-Negami-Funktion⁴³⁶

$$Z_{EP}^*(\omega) = \frac{R}{[1 + (i\omega t_{EP})^a]^b} \quad (7.5)$$

mit $t_{EP} = RC$. In dieser Arbeit wurde die Havriliak-Negami-Funktion, die einer Verteilung von RC-Schwingkreisen entspricht, verwendet. Der Widerstand Z_S hängt über

$$\varepsilon_S^*(\omega) = \frac{1}{i\omega C_0 Z_S^*(\omega)} = \varepsilon_\infty + \frac{\sigma_{DC}}{i\varepsilon_0 \omega} + \sum_{i=A, B, C} \frac{\Delta\varepsilon_i}{1 + (i\omega\tau_i)^{a_i}} \quad (7.6)$$

von den Relaxationsprozessen sowie der Gleichstromleitfähigkeit ab. Mit den Definitionen für Z_{EP}^* sowie Z_S^* wird die gemessene Permittivität durch

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{\varepsilon_S^*(\omega)}{1 + i\omega C_0 Z_{EP}^*(\omega) \varepsilon_S^*(\omega)} \quad (7.7)$$

angepasst. Bild 7.7 zeigt als Beispiel für eine solche Anpassung die Messung der 66 Mol-%-Probe bei $T = 210$ K. Um die Zahl der freien Parameter während der Anpassung von $\varepsilon'(\omega)$ und $\varepsilon''(\omega)$ zu reduzieren, wurden die Zeiten τ der Prozesse B und C aus der leitfähigkeitskorrigierten Permittivität $\varepsilon_d''(\omega)$ bestimmt und während der Anpassung von Gleichung (7.7) festgehalten.

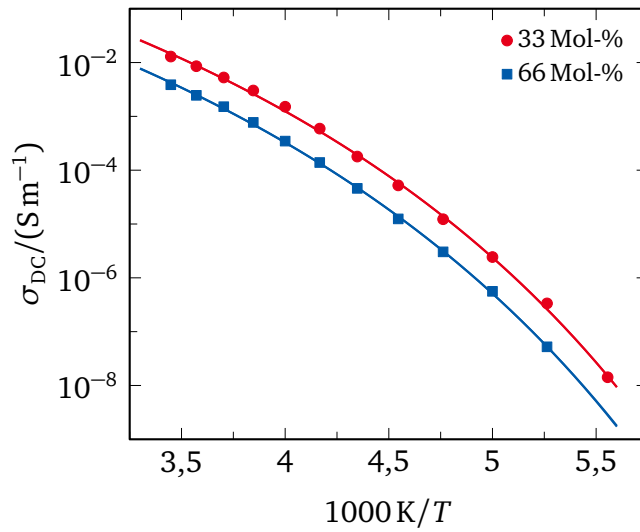


Bild 7.8: Temperaturabhängigkeit der Gleichstromleitfähigkeit der 66 Mol-%- und 33 Mol-%-Probe.

Gleichstrom-
leitfähigkeit

Zusätzlich wurde der Wert der Gleichstromleitfähigkeit direkt aus dem Plateau der Leitfähigkeitsdarstellung $\sigma'(\omega)$ bestimmt. Dies ist oberhalb einer Temperatur von

Tabelle 7.2: Parameter aus der Anpassung von Gleichung (7.8) an die Gleichstromleitfähigkeit der 66 Mol-% und 33 Mol-%-Probe.

	$a/(\text{SK cm}^{-1})$	B/K	T_0/K
33 Mol-%	18,0	1747	108
66 Mol-%	39,7	1654	109

$T = 170 \text{ K}$ möglich, die entsprechende Werte sind in Bild 7.8 aufgetragen. Beide Proben zeigen eine ähnliche Temperaturabhängigkeit, wobei die Gleichstromleitfähigkeit der 33 Mol-%-Probe etwa doppelt so groß ist wie die der 66 Mol-%-Probe. Die Temperaturabhängigkeit lässt sich in beiden Proben durch

$$\sigma_{\text{DC}}(T) = \frac{a}{T} \exp\left(-\frac{B}{T - T_0}\right) \quad (7.8)$$

mit den in Tabelle 7.2 angegebenen Parametern beschrieben.

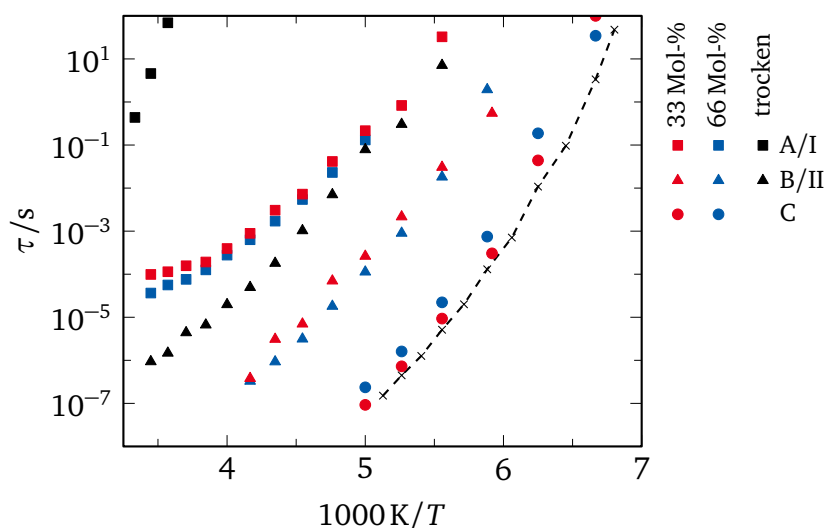


Bild 7.9: Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten. Gestrichelte Linie sind Korrelationszeiten aus dielektrischer Spektroskopie des 66 Mol-%-Bulksystems.³³⁸

Die aus der Anpassung gewonnenen Korrelationszeiten sind in Bild 7.9 zusammen mit den Korrelationszeiten der 66 Mol-%-Bulkmischung³³⁸ abgebildet. Die dielektrische Stärke sowie die Breitenparameter der Relaxationsprozesse sind in Bild 7.10 zu sehen. Wie bereits die qualitative Betrachtung der Messkurven nahelegt, weisen alle Prozesse in beiden Protein-Lösungsmittel-Mischungen vergleichbare Temperaturabhängigkeiten auf. Auch auf absoluter Zeitskala zeigen die Korrelationszeiten der Systeme nur geringe Unterschiede. Der kontinuierliche Übergang der Parameter

Parameter der Anpassung

der 33 Mol-%-Probe bei 240 K legt nahe, dass der im DSC-Experiment schwach ausgeprägte Kristallisationspeak keinen beobachtbaren Einfluss auf die Temperaturabhängigkeit der Relaxationsprozesse hat. Extrapoliert man die Prozesse zu einer Korrelationszeit von $\tau = 100$ s, erreichen sowohl Prozess B als auch Prozess C diesen Wert in einem Temperaturbereich, in dem in DSC-Messungen aus Bild 7.1 der Glasübergang beobachtet wird.

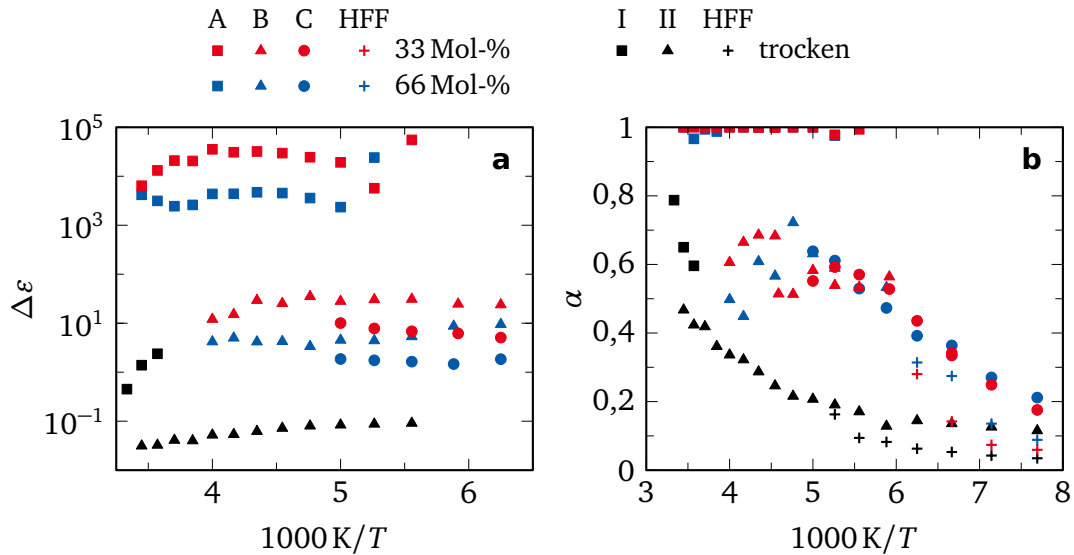


Bild 7.10: (a) Dielektrische Stärke $\Delta\epsilon$ und (b) Breitenparameter α der Lysozym-Lösungsmittel-Mischungen und des trockenen Lysozyms.

Auch die Streckungsparameter sind im gesamten beobachteten Temperaturbereich unabhängig vom Mischungsverhältnis des Lösungsmittels. Deutliche Unterschiede zeigen sich hingegen in der dielektrischen Stärke $\Delta\epsilon$, die für alle Prozesse der 33 Mol-%-Probe größer ist als die der entsprechenden Prozesse der 66 Mol-%-Probe. Dies steht im Gegensatz zu den entsprechenden Bulk-mischungen bei Raumtemperatur, für die in Simulationen und Experimenten eine höhere dielektrische Konstante für die Mischung mit höherem Wasseranteil gefunden wird.^{339,341,437,438} Der Unterschied zwischen Bulk- und Proteinsystem lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in der Anordnung der Lösungsmittelmoleküle erklären. Zusätzlich können strukturelle Unterschiede des Proteins für diese Mischungsverhältnisse einen Einfluss auf die dielektrische Stärke haben, da eine Abhängigkeit der Proteinstruktur von Mischungsverhältnis von Wasser-DMSO-Mischungen aus der Literatur bekannt ist.^{344,346}

Beginnend mit Prozess C wird in den folgenden Abschnitten genauer auf die einzelnen Prozesse eingegangen werden. Es sollen dabei Ursachen für die beobachteten

Eigenschaften und Zusammenhänge mit unterliegenden dynamischen Prozessen diskutiert werden.

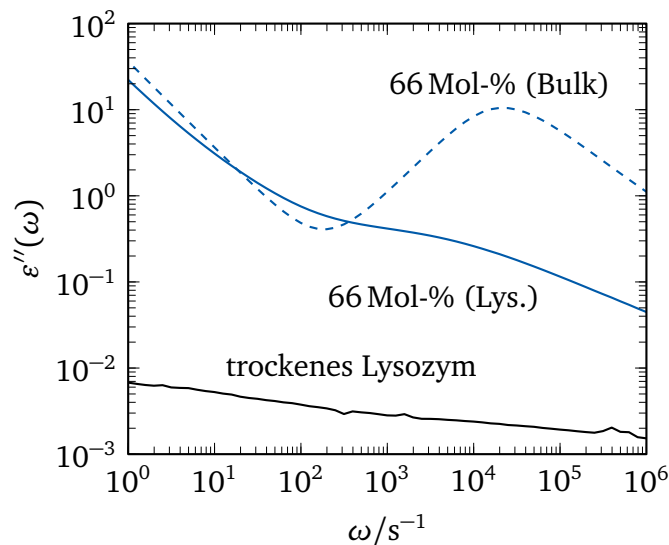


Bild 7.11: Dielektrischer Verlust $\varepsilon''(\omega)$ des trockenen Lysozyms, des 66 Mol-%-Bulklösungsmittels und des 66 Mol-%-Proteinsystems bei $T = 170$ K.

Die Korrelationszeiten legen nahe, dass die Relaxation des Lösungsmittels zu Prozess C beiträgt. Wie auch in Glycerin-Protein-Systemen tritt nur eine schwache Verlangsamung der Korrelationszeiten im Vergleich zur Bulk Mischung auf. Einige Untersuchungen an hydratisiertem Protein beobachten, dass auch das Protein aufgrund von sog. „localized diffusion“ an diesem Prozess teilnimmt.^{101,109,275} Ob dies für die betrachteten Systeme der Fall ist, kann anhand der vorhandenen Daten aber nicht beantwortet werden. Die dielektrische Permittivität des Proteinsystems zeigt eine deutliche Reduzierung der Intensität im Vergleich zum Verlust des Bulksystems des Lösungsmittels, wie beispielhaft für den dielektrischen Verlust der 66 Mol-%-Probe bei $T = 170$ K in Bild 7.11 gezeigt ist. Die Reduktion stimmt mit Beobachtungen aus anderen Experimenten und Molekulardynamiksimulationen überein und lässt sich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Lösungsmittel zurückführen.^{127,283,347} Neben der geringfügigen Verlangsamung des Prozesses, die bereits anhand der Parameter in Bild 7.9 beobachtet werden konnte, ist eine Änderung der spektralen Form zu erkennen. Während der Relaxationsprozess des Bulklösungsmittels durch eine asymmetrische Cole-Davidson-Funktion beschrieben werden kann, folgt die Dynamik des Proteinsystems in Übereinstimmung mit anderen dielektrischen Untersuchungen an Protein-Lösungsmittel-Mischungen einer Cole-Cole-Funktion.^{127,386} Aus Molekulardynamiksimulationen ist eine Verlangsamung der Dynamik an Grenzflächen, z. B. Silikaporen und Proteinoberflächen, bekannt.^{40,439–441} Die Änderung der spektralen Form lässt sich somit als Folge zu-

Prozess C

sätzlicher langsamer Beiträge zur Korrelationszeitenverteilung erklären. Anders als der Bulkprozess beschreibt der Lösungsmittelprozess des Proteinsystems nicht zwingend die strukturelle Relaxation eines glasbildenden Systems. Die symmetrische Form der Suszeptibilität, deren Verteilungsbreite mit sinkender Temperatur zunimmt, lässt wie für das Elastin-Wasser-System (Abschnitt 5) die Erklärung zu, dass der Lösungsmitteldynamik eine temperaturunabhängige Energieverteilung $G(E)$ zugrunde liegt. Prozess C wäre demnach nicht mehr der strukturelle Relaxationsprozess des Bulksystems, sondern lässt sich als sekundärer Relaxationsprozess des Protein-Lösungsmittel-Systems interpretieren. Dieser Übergang des Relaxationsmechanismus wurde auch für andere Proteinsysteme gefunden^{16,147,291} und scheint ein allgemeingültiges Phänomen zu sein. Zugleich lässt sich festhalten, dass die Temperaturabhängigkeit der mittleren Korrelationszeit eine lösungsmittelabhängige Größe ist, vergleicht man die Korrelationszeiten der zuvor erwähnten Untersuchungen. Andererseits erreichen die Korrelationszeiten die Zeitskala von 100 s in einem Temperaturbereich, in dem ein Glasübergang in den DSC-Experimenten gefunden wird. Somit kann auch eine Verknüpfung zwischen Prozess C mit dem α -Prozess nicht ausgeschlossen werden.

Prozess B Prozess B ist aufgrund der Tatsache, dass er im dielektrischen Verlust fast vollständig von der Gleichstromleitfähigkeit überdeckt wird, schwierig in der Charakterisierung. Für die 66 Mol-%-Probe befindet sich das Maximum von $\varepsilon''_d(\omega)$ dieses Prozesses an der Stelle, bei der $\varepsilon' \approx \varepsilon''$ gilt, wie in Bild 7.5 zu sehen ist. Prozess B der 33 Mol-%-Probe ist im Vergleich zum Schnittpunkt zu niedrigeren Frequenzen verschoben. Bei Frequenzen unterhalb des Kreuzungspunkts setzt ionische Gleichstromleitfähigkeit ein.^{442,443} Gleichzeitig werden in diesem Frequenzbereich auch Maxwell-Wagner-Prozesse erwartet.^{444,445} Aufgrund von dielektrischen Messungen an hydratisiertem Lysozym von Nakanishi und Sokolov, bei denen die Packungsdichte des Materials variiert wurde, kamen diese jedoch zu dem Schluss, dass dieser Prozess in ihrem System durch Proteindynamik verursacht wird.¹⁵⁵ In hydratisierten Proteinsystemen findet sich eine Zuordnung zu stark gebundenem Hydratwasser,^{9,153} in anderen Untersuchungen wird er hingegen der Proteinrelaxation zugeordnet.^{125,148,155,446,447} Daher kann Prozess B dem Prozess II des trockenen Proteins entsprechen, der durch Anwesenheit des Lösungsmittels beschleunigt wird. In lösungsmittelabhängigen Untersuchungen der Proteindynamik mittels dielektrischer Spektroskopie wurde eine solche Beschleunigung um mehrere Größenordnungen beobachtet.^{28,119,291} Die Verteilungsbreite des Prozesses weist auf einen Weichmacher-Effekt des Lösungsmittels hin,¹⁹ da mit $\alpha \approx 0,6$ eine geringere Breite als für den Prozess des trockenen Proteins gefunden wird. Wie Prozess II des trockenen Proteins ist die Verteilung zwar ebenfalls durch eine Cole-Cole-Funktion beschreibbar, allerdings ist der Breitenparameter im Rahmen der Ungenauigkeit temperaturunabhängig. Dies spricht gegen die Annahme einer temperaturunabhängigen Energieverteilung, wie sie zur Charakterisierung

von Prozess C und auch Prozess II herangezogen wurde. Die Beschreibung der Proteindynamik als fraktionaler Ornstein-Uhlenbeck-Prozess^{40,218,219,448} führt ebenfalls zu einer Cole-Cole-Suszeptibilität und kann hier einen möglichen Erklärungsansatz geben. Im Temperaturbereich zwischen 170 K und 200 K, in dem Korrelationszeiten

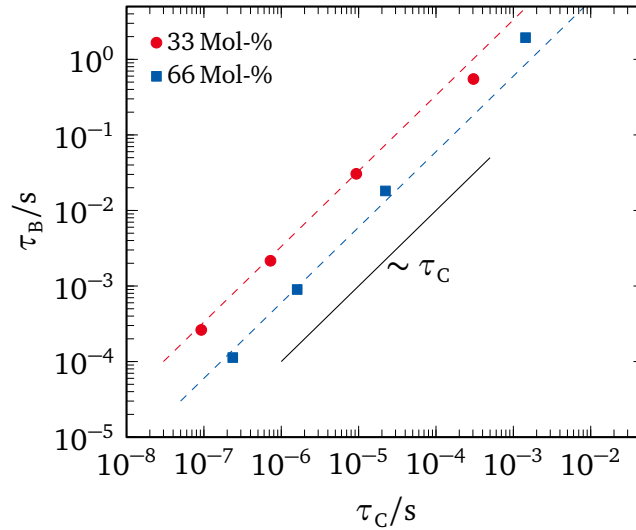


Bild 7.12: Korrelationszeit τ_B in Abhängigkeit von τ_C für 33 Mol-% und 66 Mol-%. Linien entsprechen einem linearen Zusammenhang zwischen den Korrelationszeiten.

sowohl für Prozess C als auch für Prozess B bestimmt werden können, ist ein direkter Vergleich der beiden Prozesse möglich (Bild 7.12). Für beide Mischungsverhältnisse unterscheiden sich die Korrelationszeiten um drei Größenordnungen, zeigen aber die gleiche Temperaturabhängigkeit. Ähnliche Zusammenhänge zwischen Protein und Lösungsmittel wurden auch in anderen Untersuchungen beobachtet.^{9,27,283,413} Ob diese Proportionalität auch für tiefere Temperaturen noch existiert, ist hinsichtlich des Glasübergangs interessant, kann aber anhand der Daten nicht geklärt werden.

Prozess B scheint zudem eng mit der Gleichstromleitfähigkeit verknüpft zu sein. Zum einen stimmt die gefundene Korrelationszeit τ_C mit dem Einsetzen des Leitfähigkeitsplateaus in der Auftragung von $\sigma'(\omega)$ überein (vgl. Bild 7.6e-h), wie es beispielsweise in ionischen Flüssigkeiten beobachtet wird.⁴⁴⁹ Zum anderen zeigen die Korrelationszeiten in beiden Mischungen eine deutliche Proportionalität von $\tau \sim \sigma_{DC}^{-1}$ (vgl. Bild 7.13), wie er in der Nernst-Einstein-Gleichung erwartet wird.⁴⁵⁰ Zwar zeigen auch Prozess A und C diese Proportionalität, wie in Bild 7.13 bzw. Bild 7.12 zu sehen ist, allerdings ist nur Prozess B in der gleichen Größenordnung wie die mit der Gleichstromleitfähigkeit verknüpften Zeitkonstanten²⁰⁷

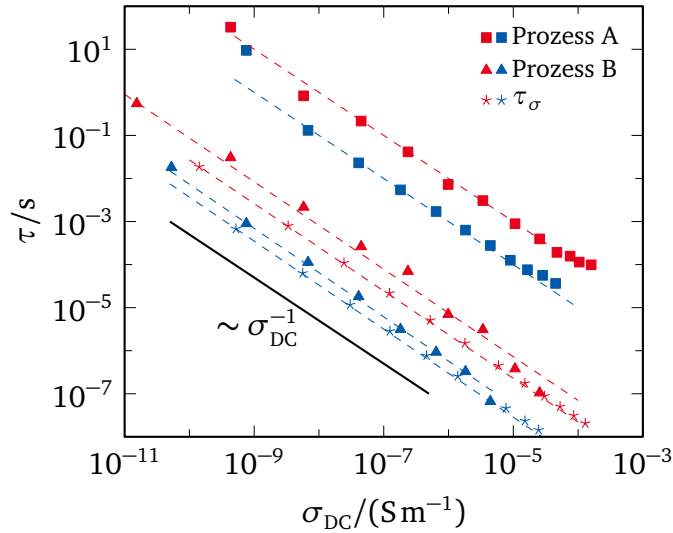


Bild 7.13: Korrelationszeiten τ von Prozess A und B der 66 Mol-%- und 33 Mol-%-Probe in Abhängigkeit von der Gleichstromleitfähigkeit σ_{DC} . Gestrichelte Linien folgen einer σ_{DC}^{-1} -Abhängigkeit und dienen zur Orientierung.

$$\tau_{\sigma} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{\infty}}{\sigma_{\text{DC}}} . \quad (7.9)$$

Die gemachten Beobachtungen deuten daher darauf hin, dass im beobachteten Temperaturbereich der langreichweitige Ladungstransport mit der Proteindynamik gekoppelt ist. In Polymerelektrolyten wird eine ähnliche Kopplung der Ionendiffusion an die Polymerreorientierung beobachtet.^{451–453}

Prozess A Der langsamste Beitrag, der beobachtet wurde, ist Prozess A. Der Prozess ist nahezu Arrhenius-artig und hat oberhalb von $T = 250 \text{ K}$ eine schwächere Temperaturabhängigkeit. Bemerkenswert ist seine hohe dielektrische Stärke von $\Delta\varepsilon \approx 10^4 - 10^5$ und seine spektrale Form, die im gesamten Temperaturbereich durch eine Debye-Funktion beschrieben werden kann. In beiden Punkten weist er Ähnlichkeit zu den Eigenschaften von Elektrodenpolarisation auf.²⁰⁷ Sollte er ein Polarisierungseffekt sein, könnte er durch den Ladungstransport, der auch die Gleichstromleitfähigkeit σ_{DC} erzeugt, entstehen. Wie in Bild 7.13 zu sehen ist, zeigen auch die Zeiten τ_{A} eine Proportionalität zur inversen Gleichstromleitfähigkeit σ_{DC}^{-1} , was sowohl für Maxwell-Wagner-Sillars-Prozesse als auch Elektrodenpolarisation erwartet wird.²⁸⁵

Mit dem Ladungstransport ist zum einen die Zeit τ_{σ} der Gleichstromleitfähigkeit verknüpft, die in diesen Systemen der Korrelationszeit τ_{B} entspricht. Zum anderen bestimmt er auch die Zeitskala τ_{EP} der Elektrodenpolarisation, die die Ausbildung

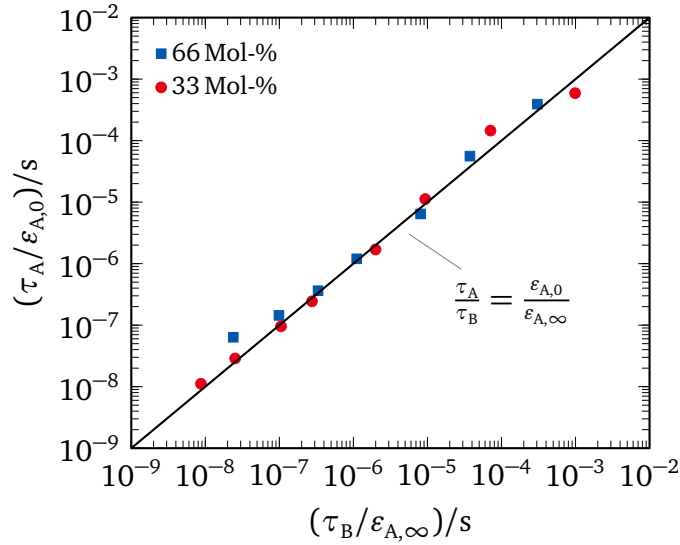


Bild 7.14: Um statische Permittivitäten reduzierte Korrelationszeiten τ_A in Abhängigkeit von τ_B . Die statischen Permittivitäten wurden entsprechend Gleichung (7.12) mit $\epsilon_{A,0} \approx \Delta\epsilon_A$ und $\epsilon_{A,\infty} \approx \Delta\epsilon_B + \Delta\epsilon_C$ genähert. Schwarze Linie kennzeichnet Gleichung (7.11).

der Ladungsschicht an der Elektrode beschreibt.⁴⁵⁴ Beide Zeiten sind über den Elektrodenabstand L der Messzelle und die Debye-Länge L_D der Ladungsträgerschicht

$$\tau_{EP} = \frac{L}{2L_D} \tau_\sigma \quad (7.10)$$

miteinander verbunden.^{454,455} Die beiden Längen beeinflussen zudem die gemessene Höhe der Permittivität, sodass das Verhältnis der beiden Zeiten über

$$\frac{\tau_{EP}}{\tau_\sigma} = \frac{\epsilon_{EP0}}{\epsilon_{EP,\infty}} \quad (7.11)$$

mit der statischen Permittivität $\epsilon_{EP,\infty}$ vor Einsetzen der Elektrodenpolarisation und der Permittivität ϵ_{EP0} danach zusammenhängt.⁴⁵⁶ Das Verhältnis $\epsilon_{EP0}/\epsilon_{EP,\infty}$ lässt sich mit den dielektrischen Stärken

$$\frac{\epsilon_{EP0}}{\epsilon_{EP,\infty}} \approx \frac{\Delta\epsilon_A}{\Delta\epsilon_B + \Delta\epsilon_C} \quad (7.12)$$

nähern. Die um die entsprechenden Permittivitäten reduzierten Korrelationszeiten von Prozess A und B in Bild 7.14 zeigen für beide Proben den in Gleichung (7.11) beschriebenen Zusammenhang zwischen Permittivität und Korrelationszeit. Zusammen mit den zuvor gemachten Beobachtungen unterstützt dies die Annahme,

dass Prozess A ein Resultat von Elektrodenpolarisation ist[†] und es sich somit nicht um einen dynamischen Prozess des Protein-Lösungsmittel-Systems handelt. Eine Aufspaltung von Elektrodenpolarisation in einen an die Gleichstromleitfähigkeit gekoppelten Anteil und einen nicht systemimmanenten Anteil findet sich auch in der Literatur.²¹⁵ Es ist nicht auszuschließen, dass auf dieser Zeitskala auch dynamische Prozesse stattfinden, die Messdaten dieser Arbeit lassen darauf aber keine Rückschlüsse zu. Allerdings finden sich in der Literatur auch Untersuchungen, die vergleichbare Signalbeiträge mit dem α -Prozess des Protein-Lösungsmittel-Systems in Verbindung bringen.^{25,28,155,458,459} In Anbetracht der hier gemachten Beobachtungen ist diese Verknüpfung kritisch zu sehen. Wie in Bild 7.9 erkennbar ist, sind die Zeiten von Prozess A bei der Temperatur T_g auf einer deutlich langsameren Zeitskala als für den Glasübergang erwartet. Daher ist eine Verbindung zwischen Prozess A und dem α -Prozess für die hier untersuchten Systeme vermutlich nicht vorhanden.

Zusammen-
fassung der
Befunde

Mithilfe dielektrischer Spektroskopie wurde die Wechselwirkung zwischen Lysozym und dem binären Lösungsmittel Wasser-DMSO bei zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen, jedoch konstanter Lösungsmittelteilchenzahl untersucht. Zur Charakterisierung hatte sich eine Betrachtung der Messdaten nicht nur in der Permittivitätsdarstellung $\epsilon^*(\omega)$, sondern auch in anderen Darstellungsmöglichkeiten als erfolgreich herausgestellt. Dadurch konnten zwei Signalbeiträge als Relaxationsprozesse identifiziert werden, die der Lösungsmitteldynamik bzw. der Proteindynamik zugeordnet werden können. Durch die fehlende Selektivität der Messmethode ist jedoch eine genauere Klärung, wie groß Beiträge von Seitenketten- und Proteinerückgratdynamik im Einzelnen sind, nicht möglich. Die Gleichstromleitfähigkeit weist in den untersuchten Systemen ähnlich wie in Polymerelektrolyten auf eine Kopplung an die Reorientierung des Proteins hin. Sowohl die Protein- als auch die Lösungsmitteldynamik zeigen nur eine geringe Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis des Lösungsmittels. Wie auch in der entsprechenden Bulk Mischung zeigen beide Lösungsmittelkomponenten keinen beobachtbaren dynamischen Unterschied. Die Korrelationszeiten der Lösungsmitteldynamik sind nur schwach vom Protein beeinflusst, während die Korrelationszeitenverteilung durch die Anwesenheit des Proteins verbreitert wird. Die Lösungsmitteldynamik zeigt am Protein Einflüsse einer unterliegenden Energieverteilung aufgrund der Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung. Die Anwesenheit des Lösungsmittels bewirkt eine Beschleunigung der Proteindynamik und weist auf einen möglichen Weichmacher-Effekt des Lösungsmittels hin.¹⁹ Der Vergleich der Temperaturabhängigkeit von Lösungsmittel- und Proteinprozess deutet oberhalb von 170 K auf eine Kopplung zwischen beiden Prozessen hin, wie sie im Rahmen des Versklavungsmodells vorhergesagt wird.^{18,45} Die veränderten Eigenschaften des Lösungsmittelprozesses weisen aber darauf hin, dass eine wechselseitige

[†] If it looks like a duck, swims like a duck, and quacks like a duck, then it probably is a duck.⁴⁵⁷

Beeinflussung von Protein und Lösungsmittel existiert, die das Versklavungsmodell alleine nicht erklärt werden kann.

7.3 ^2H -NMR: Wasserdynamik

Die Isotopenanreicherung einer Lösungsmittelkomponente mit ^2H ermöglicht es, in ^2H -NMR-Experimenten gezielt deren Dynamik zu charakterisieren. Damit lassen sich die im vorherigen Abschnitt gemachten Beobachtungen erweitern, um so ein ganzheitlicheres Bild von den betrachteten Systemen zu erhalten. Für die Lysozym-Wasser-DMSO-Mischungen wurden beide Komponenten auf diese Weise untersucht, wobei zunächst die Dynamik des Wasser diskutiert wird.

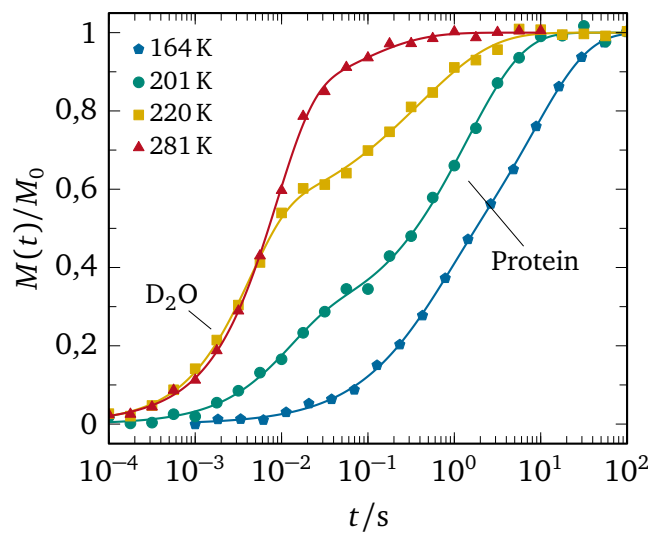


Bild 7.15: Aufbaukurven der 66 Mol-%-Mischung bei Verwendung von D_2O für ausgewählte Temperaturen.

Bei der Untersuchung der Dynamik der Systeme, in denen D_2O als Lösungsmittel verwendet wurde, ist zu beachten, dass durch chemischen Austausch neben dem Hydratwasser auch N–H-Gruppen im Protein beobachtet werden⁴⁶⁰ (siehe Tabelle D.2). Die Messdaten müssen daher für die betrachteten Systeme durch einen zweistufigen Magnetisierungsaufbau

Spin-Gitter-
Relaxation

$$M(t) = \sum_{i=s,p} M_{0,i} \left\{ 1 - \exp \left[- \left(t / T_{1,i} \right)^{\beta_i} \right] \right\} \quad (7.13)$$

beschrieben werden, wobei die Indizes s und p den Beitrag des Lösungsmittels bzw. des Proteins repräsentieren. Die mittleren Spin-Gitter-Relaxationszeiten $\langle T_1 \rangle$ sind für beide Mischungsverhältnisse in Bild 7.16 abgebildet. Die zugehörigen Stre-

ckungsparameter β sowie die Gleichgewichtsmagnetisierungen $M_0 T$ finden sich in Bild 7.17.

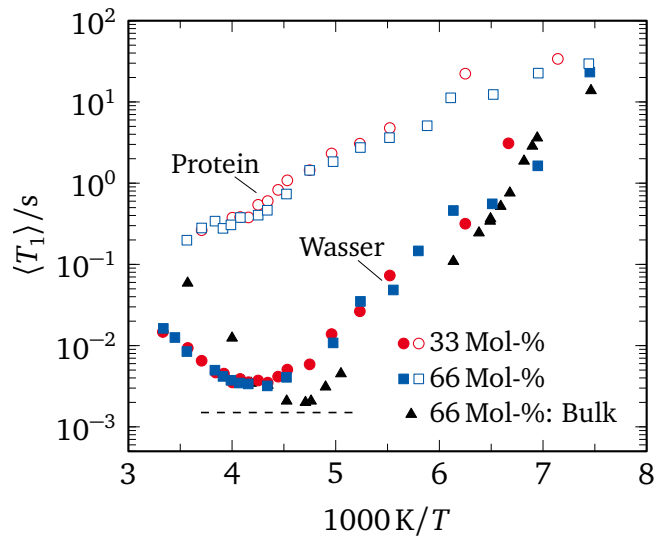


Bild 7.16: Temperaturabhängigkeit der mittleren Spin-Gitter-Relaxationszeit $\langle T_1 \rangle$ des Protein- (offene Symbole) und Wasserprozesses (gefüllte Symbole). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die erwartete Höhe des Minimums bei einer exponentiellen Korrelationsfunktion. Zum Vergleich ist zusätzlich die Temperaturabhängigkeit der 66 Mol-%-Bulkmischung³³⁸ abgebildet.

Für die mittleren Spin-Gitter-Relaxationszeiten des Wasserprozesses ist keine Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis zu beobachten. In beiden Fällen durchlaufen die Relaxationszeiten ein Minimum von ungefähr 3,3 ms bei $T \approx 242$ K. Unterhalb von $T \approx 160$ K sind die Relaxationszeiten von Wasser- und Proteinkomponente nur noch schwer zu unterscheiden. Die Minima der Proteinsysteme befinden sich sowohl in der Höhe als auch in der Temperatur bei höheren Werten als das Minimum des 66 Mol-%-Bulksystems³³⁸ (Bild 7.16a). Die erhöhte Relaxationszeit weist auf eine größere Verteilungsbreite der Lösungsmitteldynamik am Protein hin. Die höhere Temperatur der beobachteten T_1 -Minima ist wiederum ein Anzeichen verlangsamter Dynamik an der Proteinoberfläche, wie sie auch aus anderen Untersuchungen von Proteinsystemen bekannt ist.^{7,121,126,137,140} Der Magnetisierungsaufbau des Wasserprozesses ist exponentiell bis zu einer Temperatur von $T \approx 190$ K (vgl. Bild 7.17). Unterhalb dieser Temperatur fällt der Streckungsparameter β auf etwa 0,6 ab. Die Intensität der Gleichgewichtsmagnetisierung nimmt ab 250 K ab und durchläuft etwas unterhalb von 200 K ein Minimum mit einem Wert von $M \approx 0,15$. Die Signalintensität der 66 Mol-%-Mischung ist über einen größeren Temperaturbereich reduziert.

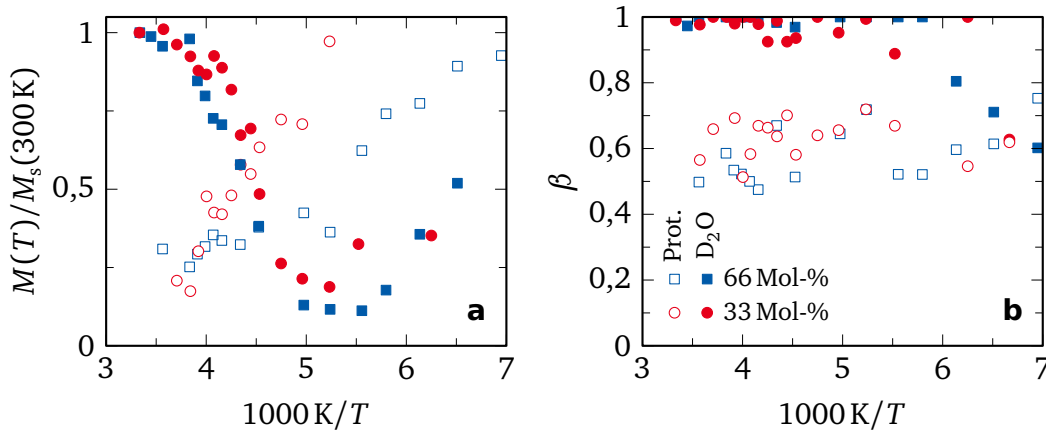


Bild 7.17: Temperaturabhängigkeit der Magnetisierung M und des Streckungsparameters β des 66 Mol-%- und des 33 Mol-%-Systems.

Der Magnetisierungsaufbau des Proteinprozesses ist nichtexponentiell mit einem temperaturunabhängigen Streckungsparameter von $\beta \approx 0,5$ bei 66 Mol-% Wasser bzw. 0,6 für die 33 Mol-%-Mischung (Bild 7.17b). Dies bedeutet, dass die unterliegende Proteindynamik unterhalb von 300 K auf der experimentellen Zeitskala noch nicht ergodisch ist.⁵³ Daraus folgt für den beobachteten Glasübergang, dass er nicht durch einen α -Prozesses des Proteins verursacht wird, da dieser die Ergodizität des Systems wiederherstellen würde. Der Mischungsabhängigkeit des Streckungsparameters wurde auch in der Auswertung der dielektrischen Spektroskopie in dieser Art beobachtet (Bild 7.10). Die mittleren Spin-Gitter-Relaxationszeiten $\langle T_1 \rangle$ des Proteins zeigen im beobachteten Temperaturbereich kein Minimum, sondern steigen mit sinkender Temperatur kontinuierlich an. Die Relaxationszeiten des 33 Mol-%-Systems sind hierbei im gesamten Temperaturbereich geringfügig höher. Beide Systeme zeigen jedoch eine vergleichbare Temperaturabhängigkeit. Bei einer Temperatur von etwa 210 K wird für beide Mischungsverhältnisse eine Änderung der Temperaturabhängigkeit beobachtet. Sowohl das Ansteigen der Magnetisierung mit sinkender Temperatur in Bild 7.17a als auch die Spektrenform (Bild 7.19a) deuten darauf hin, dass die mittlere Korrelationszeit der Proteindynamik jenseits der Mikrosekundenskala ist. Die Magnetisierung der 66 Mol-%-Mischung weist eine schwächere Temperaturabhängigkeit der Magnetisierung auf, was zusammen mit der stärkeren Nichtexponentialität auf eine breitere Verteilung von Korrelationszeiten hinweist.

Für hydratisierte Proteine beobachtet man, dass die Wasserdynamik nur schwach von der Wahl des untersuchten Proteins abhängt.^{16,23,291,463} Bild 7.18 zeigt Spin-Gitter-Relaxationszeiten für Wasser-DMSO-Mischungen an Lysozym im Vergleich mit dem 33 Mol-%-System an Elastin⁴⁶¹ und Myoglobin⁴⁶² bei einem Solvatationsgrad von $s = 0,3$. Die Temperatur des $\langle T_1 \rangle$ -Minimums ist für Myoglobin vergleichbar zu den

Einfluss der
Proteinwahl

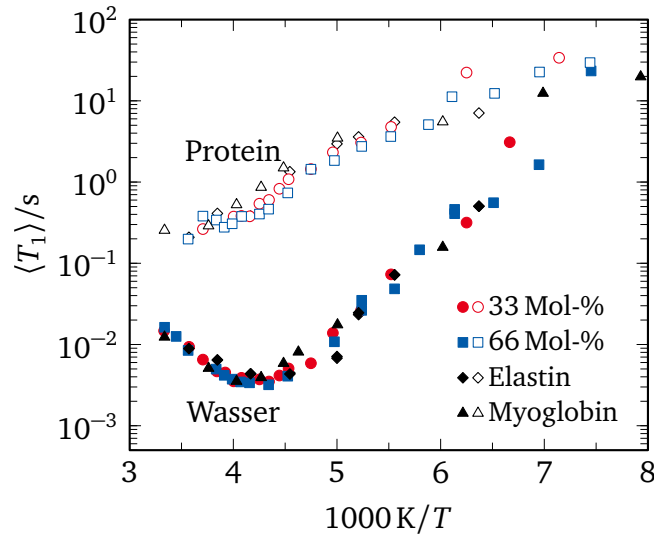


Bild 7.18: Spin-Gitter-Relaxationszeiten bei Verwendung von Elastin⁴⁶¹ und Myoglobin⁴⁶² als Protein im Vergleich mit den untersuchten Systemen. Als Lösungsmittel des Elastin- und des Myoglobinsystems wurden 66 Mol-%-Mischungen bei Solvatationsgraden von $s = 0,3$ verwendet.

Temperaturen der Lysozym-Systeme, für Elastin ist sie etwas erniedrigt. Weder der Unterschied im Solvatationsgrad noch der Wechsel des Proteins zeigen starke Auswirkungen auf die Spin-Gitter-Relaxation. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen an hydratisierten Proteinen scheint somit die Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel auch für Wasser-DMSO-Mischungen nicht proteinspezifischer Natur zu sein.

Linienform-
übergang

Der Übergang der Linienform von Wasser von einer Lorentzlinie zu einem Pakespektrum mit sinkender Temperatur wird durch das bereits vorhandene statische Spektrum der Proteinkomponente überlagert. Der Anteil des Proteins kann durch die passende Wahl der Wartezeit t_d des Magnetisierungsaufbaus unterdrückt werden. Temperaturabhängig wurden dafür Wartezeiten zwischen 10 ms und 100 ms gewählt. Für $T = 191$ K ist in Bild 7.19a der Vergleich eines solchen teilrelaxierten Spektrums, aufgenommen bei $t_d = 17$ ms, und eines vollrelaxierten Spektrums mit $t_d = 100$ s gezeigt. Auch teilrelaxiert besteht das Spektrum der Wasserkomponente aus einer Überlagerung von Lorentzlinie und Pakespektrum, Aus der Anpassung dieser Zweikomponentenspektren folgt der Gewichtungsfaktor $W(T)$, der den Anteil schneller Dynamik bezüglich der inversen Kopplungskonstanten $\tau^* = 1/\delta = 1/(2\pi \cdot 160 \text{ kHz}) = 1 \mu\text{s}$ beschreibt. Der Temperaturverlauf des Gewichtungsfaktors in Bild 7.19b kann für beide Mischungen mit Gleichung (3.69) beschrieben werden. Die Gewichtungsfaktoren und Gleichgewichtsmagnetisierung $M(T)$ in Bild 7.17b, die ebenfalls auf

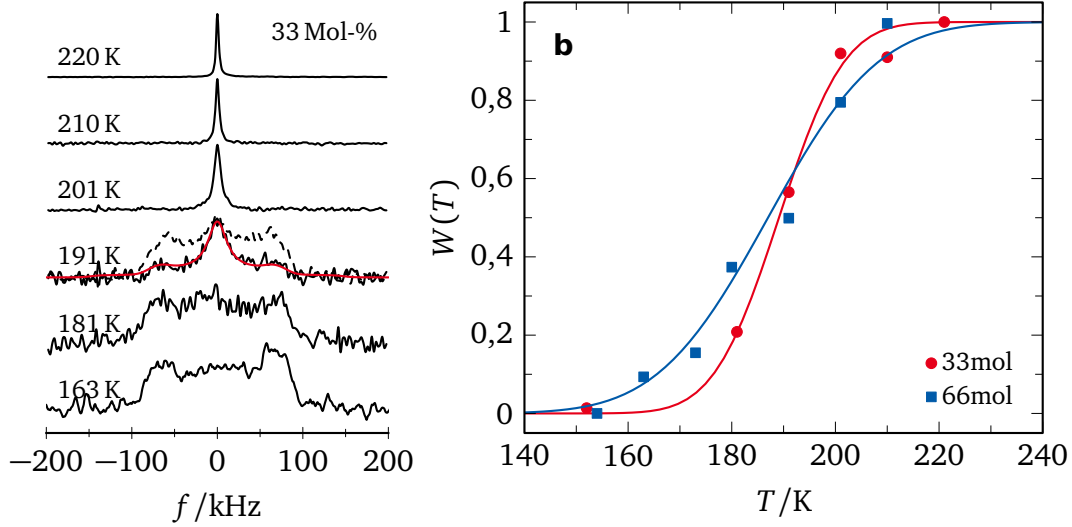


Bild 7.19: (a) Zweikomponentenspektren von D₂O des 33 Mol-%-Systems im teilrelaxierten Zustand. Zum Vergleich ist für 191 K das vollrelaxierte Spektrum mit dem zusätzlichen Beitrag des Proteins abgebildet (gestrichelte Linie). Die rote Linie ist die Anpassung des Spektrums als Überlagerung aus Lorentzlinie und Pakespektrum. (b) Relativer Anteil der Lorentzkomponente am Gesamtspektrum, Linien sind Anpassungen nach Gleichung (3.69).

Dynamik auf dieser Zeitskala sensitiv ist, zeigen eine vergleichbare Abhängigkeit von der Mischungszusammensetzung. Beide Größen legen nahe, dass bei ungefähr 188 K die Zeit τ^* erreicht wird und dass sich die Verteilung des 66 Mol-%-System über einen etwas größeren Temperaturbereich auf der experimentellen Zeitskala befindet.

Um Dynamik der Wassermoleküle auf der Millisekunden- bis Sekundenzeitskala zu beobachten, wurden unterhalb von 175 K Stimulierte-Echo-Experimente (Abschnitt 3.3) durchgeführt. In diesem Experiment ist auch unterhalb der Glasübergangstemperatur des jeweiligen Systems noch ein mehrstufiger Abfall aus Korrelationsverlust und Spin-Gitter-Relaxation zu erkennen. Es wurden temperaturabhängig Spin-Alignment-Experimente bei einer Evolutionszeit von $t_{ev} = 3 \mu s$ durchgeführt. Die kurze Evolutionszeit ermöglicht es, aus der gemessenen Korrelationsfunktion $F^{ss}(t_m)$ über die Näherung

$$F^{ss}(t_m) = \langle \sin[\omega_Q(0)t_{ev}] \cdot \sin[\omega_Q(t_m)t_{ev}] \rangle$$

$$\stackrel{t_{ev} \rightarrow 0}{\approx} t_{ev}^2 \langle \omega_Q(0)\omega_Q(t_m) \rangle \propto F_2(t_m) \quad (7.14)$$

direkt auf die Korrelationsfunktion $F_2(t_m)$ schließen zu können. Die Auswertung für Protein-Wasser-Systeme wird dadurch erschwert, dass Wasser- und Proteindy-

Stimuliertes
Echo

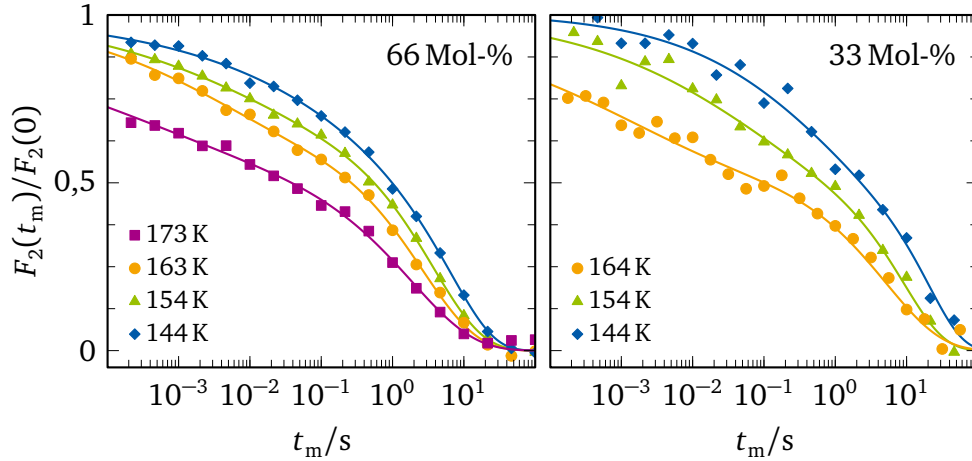


Bild 7.20: Stimulierte-Echo-Messungen von D₂O in Lysozym-Wasser-DMSO-Mischungen.

namik zum Messsignal beitragen. Auf eine Messung im teilrelaxierten Zustand, d. h. bei kurzen Wartezeiten t_d , für die noch keine Magnetisierung der Proteinstufe zu beobachten ist, wurde verzichtet. Bei Verteilungen von Korrelationszeiten, wie sie hier vorhanden sind, werden dadurch langsame Teile der Verteilung gefiltert und kürzere Korrelationszeiten beobachtet, die nicht die gesamte Verteilung widerspiegeln.^{409,464,465} Daher muss im allgemeinen Fall eine Superposition beider Prozesse

$$F_2(t_m) = p_s F_{2,s}(t_m) R_s(t_m) + p_p F_{2,p}(t_m) R_p(t_m) \quad (7.15)$$

zur Anpassung angenommen werden. Korrelationsabfall $F_{2,i}(t_m)$ und Relaxationsabfall $R_i(t_m)$ der jeweiligen Komponente tragen mit dem Anteil p_i zum Gesamtsignal bei. Zwei Punkte vereinfachen diese Anpassungsfunktion: Zum einen ist die Proteindynamik im beobachteten Temperaturbereich außerhalb des experimentellen Zeitfensters, sodass $F_{2,p}(t_m) = F_{\infty,p}$ gilt. Zum anderen unterscheiden sich die Relaxationszeiten beider Anteile nur noch wenig voneinander, wie am Beispiel des Magnetisierungsaufbaus bei 163 K in Bild 7.15 zu erkennen ist. Deshalb wird die Annahme getroffen, dass der Relaxationsabfall $R_s(t_m) \approx R_p(t_m) = R(t_m)$ erfüllt. Die gegebene Funktion wird mit diesen Annahmen zu

$$F_2(t_m) = [p_s F_{2,s}(t_m) + p_p F_{\infty,p}] R(t_m) \quad (7.16a)$$

$$= \left\{ A_0 \exp \left[- \left(\frac{t_m}{\tau_s} \right)^{\beta_s} \right] + A_{\infty} \right\} \exp \left[- \left(\frac{t_m}{T_{1,Q}} \right)^{\beta_Q} \right], \quad (7.16b)$$

wobei $A_0 = p_s(1 - F_{\infty,s})$ und $A_{\infty} = p_s F_{\infty,s} + p_p F_{\infty,p}$ als Variablen eingeführt wurden. Mit dieser Funktion ist eine adäquate Beschreibung der Messkurven in Bild 7.20

möglich. Für beide Mischungsverhältnisse weist der Korrelationsabfall einen Streckungsparameter von $\beta \approx 0,3–0,35$, der unter dem der 66 Mol-%-Bulkmischung mit $\beta = 0,4$ liegt.³³⁸ Vergleichbare Streckungsparameter sind aus NMR-Untersuchungen der Wasserdynamik von Protein-Wasser-Systemen bekannt.¹⁶ Die Korrelationszeiten aus der Anpassung sind mit den Werten aus der Auswertung der Spin-Gitter-Relaxation und dem Lösungsmittelprozess der dielektrischen Spektroskopie (Abschnitt 7.2) in Bild 7.21 zu sehen.

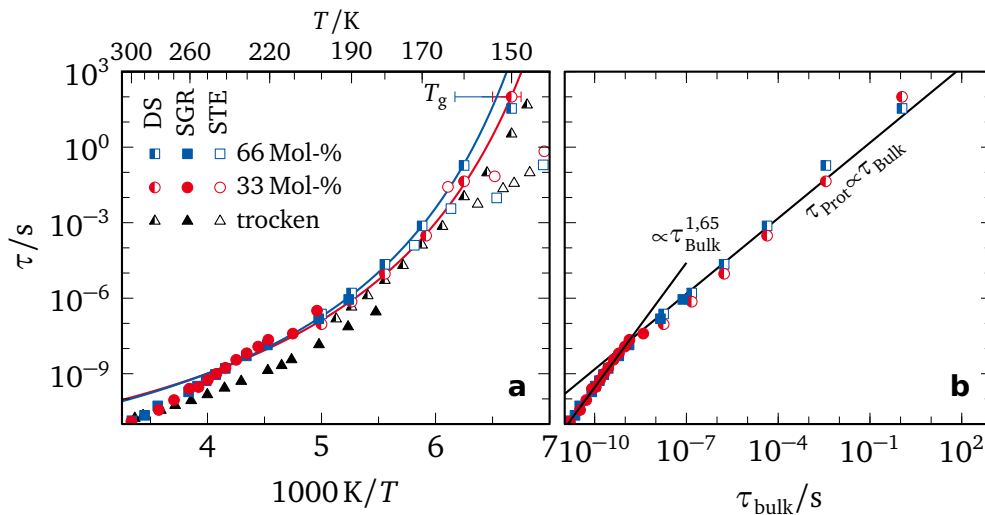


Bild 7.21: (a) Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten der 66 Mol-%- und 33 Mol-%-Systeme aus NMR-Experimenten und des Lösungsmittelprozesses aus dielektrischer Spektroskopie im Vergleich mit Bulkdaten der 66 Mol-%-Mischung.^{37,466} (b) Korrelationszeiten von D₂O der Proteinsysteme in Abhängigkeit von Korrelationszeiten der 66 Mol-%-Bulkmischung.^{146,466} Die Zeiten der Bulk Mischung aus dielektrischer Spektroskopie wurden durch Drei geteilt, um den Versatz zwischen den Messmethoden zu berücksichtigen.

Wie bereits anhand der Ähnlichkeit zwischen den Spin-Gitter-Relaxationszeiten zu erwarten war, unterscheiden sich auch die Breitenparameter der spektralen Dichten für deren Umrechnung nur schwach: Das 66 Mol-%-System kann mit einem Breitenparameter von $\alpha = 0,53$ beschrieben werden; der Wert der 33 Mol-%-Mischung beträgt $\alpha = 0,52$. Beide Werte sind vergleichbar mit den Breitenparametern aus dielektrischer Spektroskopie (Bild 7.10a). Anders als für das 66 Mol-%-Bulksystem zeigen die Korrelationszeiten keinen Versatz zwischen den unterschiedlichen Messmethoden, woraus folgt, dass die Art der Wasserbewegung durch das Protein beeinflusst wird. Während die Reorientierung des Wassermoleküls im Bulk als kleinwinklige Bewegung interpretiert wurde,³³⁸ weist die kontinuierliche Fortsetzung im Hochtemperaturbereich auf deutlich größere Sprungwinkel hin.^{467,468} Für Temperaturen

Korrelationszeiten

Tabelle 7.3: Parameter der Vogel-Fulcher-Tammann-Funktion der Korrelationszeiten in Bild 7.21.

	$\tau_0/10^{-13} \text{ s}$	B/K	T_0/K
33 Mol-%	3,727	1038	118
66 Mol-%	2,821	1052	121

unterhalb von 230 K sind die Werte der Proteinsysteme langsamer, aber im Temperaturverlauf ähnlich zu den Bulkwerten. Eine Anpassung mit der Vogel-Fulcher-Tammann-Funktion mit den Parametern in Tabelle 7.3 spiegelt den Kurvenverlauf der Messdaten in diesem Bereich gut wider. Oberhalb dieser Temperatur zeigen die Korrelationszeiten eine veränderte Temperaturabhängigkeit. Deutlich erkennbar ist die Änderung, wenn die Korrelationszeiten der Proteinsysteme in Abhängigkeit von den Werten der Bulk Mischung aufgetragen werden (Bild 7.21b). Die Werte der Proteinsysteme oberhalb dieser Temperatur sind stärker temperaturabhängig. Eine weitere Beobachtung bei allen abgebildeten Systemen ist das Auseinanderlaufen der Korrelationszeiten aus dielektrischer Spektroskopie und Stimulierten-Echo-Experimenten unterhalb von 165 K. Beide Beobachtungen werden im Folgenden genauer betrachtet, beginnend mit dem Tieftemperaturverhalten.

Tieftemperatur-
verhalten von
Wasser

Die Zeiten der Wasserdynamik für Temperaturen $T \lesssim 165 \text{ K}$, die aus den Kurven des Stimulierten Echos stammen, folgen statt dem Vogel-Fulcher-Tammann-Verhalten der dielektrischen Spektroskopie einer Arrheniusabhängigkeit mit Aktivierungsenergie $E_a \approx 0,5 \text{ eV}$ (Bild 7.22). Da die Korrelationszeiten beider Messmethoden um mehr als einen Faktor 3 voneinander abweichen, kann ausgeschlossen werden, dass der Unterschied durch die Messung der Korrelationsfunktion F_1 in dielektrischer Spektroskopie und F_2 in NMR verursacht wird.^{467,468} Ein Grund für die voneinander abweichenden Korrelationszeiten aus dielektrischer Spektroskopie und NMR kann in den Messmethoden selbst liegen. Das Dipolmoment eines Wassermoleküls ist parallel zu dessen Symmetrieachse ausgerichtet, während die Vorzugsrichtung der quadrupolaren Wechselwirkung von ^2H entlang der O^2H -Bindungsachse liegt. Somit sind Bewegungen, die die Orientierung der Symmetrieachse wenig beeinflussen (z. B. Rotationen um die Achse), in der dielektrischen Spektroskopie nur schwach ausgeprägt, können aber in ^2H -NMR detektiert werden. In Untersuchungen von Protein-Wasser-Systemen mittels NMR-Experimenten und Simulationen wurde als Bewegungsmodell für die Wasserdynamik ungenaue 180° -Sprünge vorgeschlagen,^{137,200,305,471} das die genannten Voraussetzungen erfüllen würde. Dieses Arrheniusverhalten beschreibt die Temperaturabhängigkeit zahlreicher Systemen von Wasser in Confinement und Wassermischungen.^{375,380} In Bild 7.22 sind zum Vergleich neben den Wasser-DMSO-Mischungen andere wasserhaltige Systeme abgebildet.^{155,240,291,377,469,470} Die Korrelationszeiten des 66 Mol-%-Proteinsystems stimmen

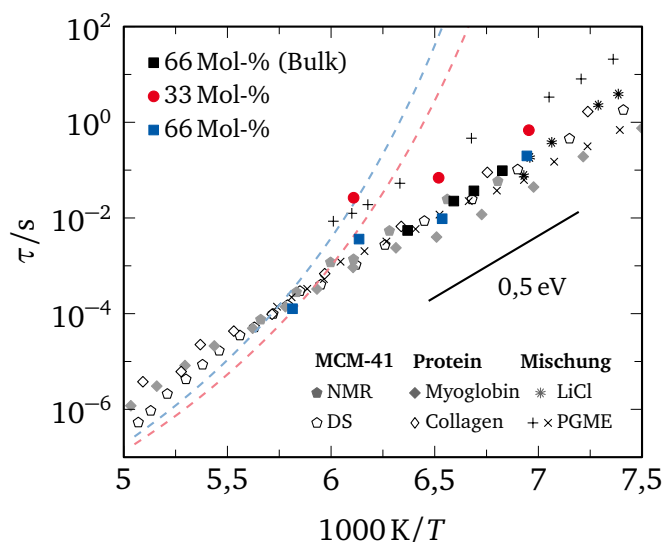


Bild 7.22: Tieftemperaturverhalten der Wasserdynamik aus Stimulierten-Echo-Experimenten der Wasser-DMSO-Mischung am Protein und im Bulk³³⁸ im Vergleich mit Wasserdynamik anderer wässriger Systeme. Gestrichelte Linien kennzeichnen das in dielektrischer Spektroskopie beobachtete Temperaturverhalten. Vergleichsdaten stammen von Wasser in MCM-41 C10 aus NMR²⁴⁰ und dielektrischer Spektroskopie,³⁷⁷ hydratisiertem Myoglobin ($h = 0,34$)¹⁵⁵ bzw. Collagen ($h = 0,4$)²⁹¹ und Wassermischungen $\text{LiCl} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ⁴⁶⁹ und Wasser-PGME (+: 37 Gew.-%, \times : 58 Gew.-%).⁴⁷⁰

mit den Werten der entsprechenden Bulk Mischung überein, während das 33 Mol-%-System signifikant langsamer ist. Von einer Beschleunigung der Wasserdynamik mit zunehmendem Wassergehalt wird auch für andere weiche Confinementsysteme und Wassermischungen berichtet,³⁸⁰ wie am Beispiel der Wasser-PGME-Mischung zu sehen ist. Wie bereits im vorigen Abschnitt bei der Beschreibung der Daten aus dielektrischer Spektroskopie erwähnt, bildet sich unterhalb von 190 K in der Suszeptibilität ein Hochfrequenzflügel aus. Es ist daher möglich, dass der Hochfrequenzflügel auf einen dynamischen Prozess zurückzuführen ist, der vom beobachteten Lösungsmittelprozess überlagert wird. Wie auch für die Bulk Mischung wird in dielektrischer Spektroskopie hauptsächlich der langsame Prozess beobachtet, während die Korrelationsfunktion, die das Stimulierte-Echo-Experiment bestimmt, mit dem schnelleren Prozess zerfällt.

Die Temperaturabhängigkeit im Bereich oberhalb von 210 K weicht in den Proteinsystemen von der des Bulksystems ab, stimmt dafür aber sehr gut mit den Korrelationszeiten hydratisierter Proteinsysteme^{16,146} überein (Bild 7.23). Für unterschiedliche Wassermischungen wurde von Cerveny et al. für Temperaturen oberhalb

Hochtemperaturverhalten von Wasser

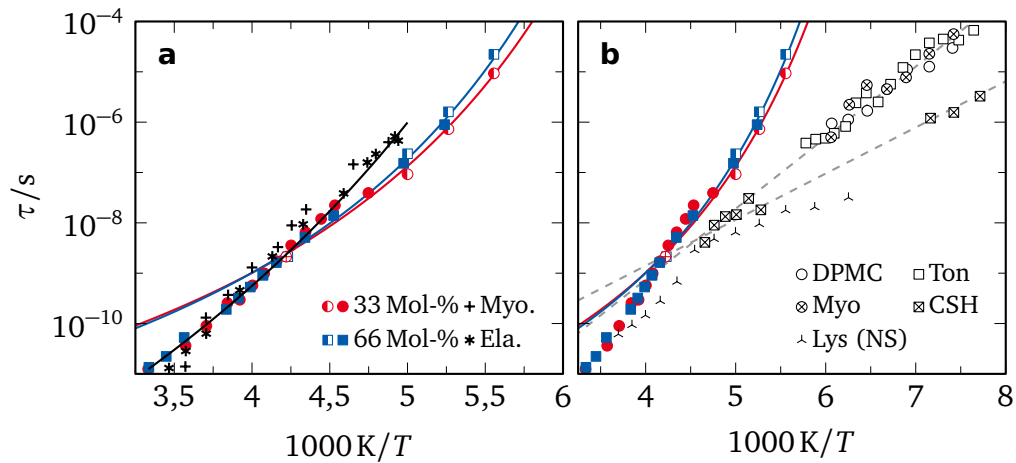


Bild 7.23: (a) Korrelationszeiten im Vergleich mit hydratisiertem Elastin¹⁶ und Myoglobin¹⁴⁶ aus NMR-Untersuchungen. Schwarze Linie stellt die Vogel-Fulcher-Tammann-Abhängigkeit für hydratisierte Systeme nach Cervený et al. dar.³⁷⁵ (b) Vergleich mit Wasserprozessen aus dielektrischer Spektroskopie von Myoglobin in Wasser-Glycerin,⁴⁷² Phospholipidmembran DPMC,⁴⁷³ Vermiculit-Ton,⁴³⁰ Zement CSH⁴⁷⁴ und hydratisiertem Lysozym.¹⁹⁷

der jeweiligen Glasübergangstemperatur eine gemeinsame Vogel-Fulcher-Tammann-Abhängigkeit $\tau_0 \propto \exp[2393 \text{ K}/(T - 96 \text{ K})]$ für die Wasserdynamik beobachtet. Diese Funktion beschreibt auch hier den Temperaturverlauf der Korrelationszeiten (schwarze Linie in Bild 7.23b). Im Gegensatz zu den von Cervený et al. betrachteten Systemen ist der Übergang der Korrelationszeiten beider Wasser-DMSO-Mischungen fast 60 K über der Glasübergangstemperatur aus kalorimetrischen Messungen (Bild 7.1). Auch keiner der Prozesse, die in dielektrischen Spektren beobachtet wurden, ist bei dieser Temperatur auf einer Zeitskala von 100 s für einen Glasübergang.

Für Protein-Wasser-Systeme, z. B. hydratisiertes Lysozym (Bild 7.23b) wird bei $T = 225 \text{ K}$ ein Flüssig-Flüssig-Phasenübergang postuliert, der zu einem Übergang von einer Vogel-Fulcher-Tammann- zu einer Arrhenius-Beschreibung der Korrelationszeiten führt.^{120,197–199} Die Existenz des Phasenübergangs wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert, da in anderen Untersuchungen keine Änderung der Temperaturabhängigkeit gefunden wird.^{16,23,154,155,200,201} In dielektrischer Spektroskopie wurde für verschiedene wasserhaltige Systeme ein Prozess mit Aktivierungsenergie $E_A \approx 0,2 \text{ eV} - 0,4 \text{ eV}$ beobachtet.^{377,380,430,473,474} Die Extrapolation dieser Prozesse kreuzt im Bereich von 220 K bis 240 K den Lösungsmittelprozess der untersuchten Systeme (Bild 7.23b). Eine Ursache für diese Prozesse konnte nicht ausgemacht werden, Erklärungsansätze reichen von der Reorientierung von Hydroxygruppen⁴⁷⁴

über „Bjerrum-like defects“⁴⁷² bis hin zur Dynamik langsamer Wassermoleküle an Grenzflächen.³⁷⁷ In anderen Untersuchungen¹⁵⁵ und auch in dieser Arbeit wurde dieser Prozess allerdings nicht beobachtet. Keiner der genannten Ansätze liefert an dieser Stelle eine abschließende Erklärung für die Änderung in der Temperaturabhängigkeit.

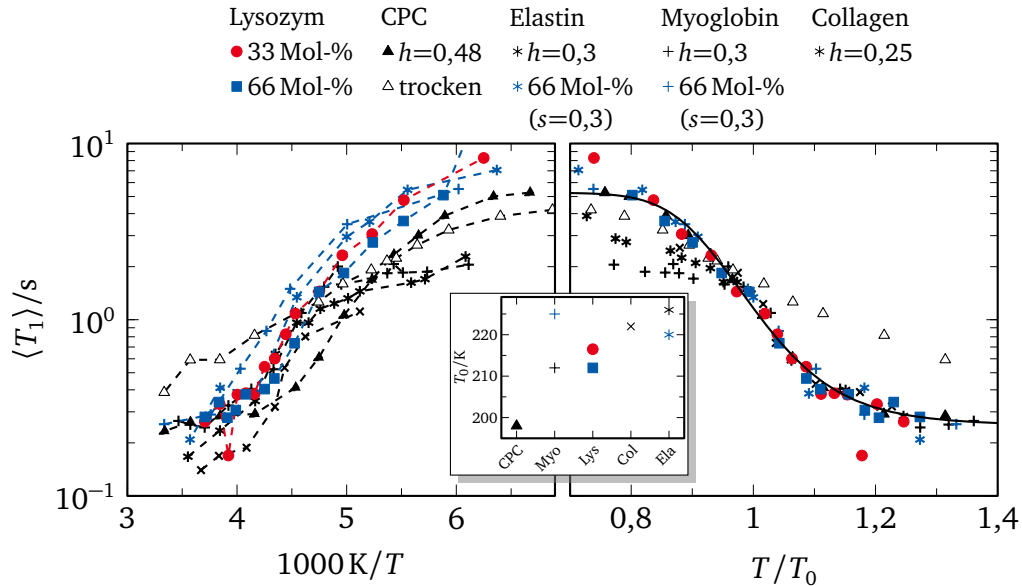


Bild 7.24: (a) Mittlere Spin-Gitter-Relaxationszeit $\langle T_1 \rangle$ der Proteinstufe im Vergleich mit hydratisierten Myoglobin,²⁰⁰ Elastin und Collagen,¹⁶ trockenem und hydratisiertem CPC¹⁴⁵ sowie Myoglobin⁴⁶² und Elastin⁴⁶¹ in Wasser-DMSO; die Linien dienen der Orientierung. (b) Daten wie in (a), skaliert auf den Wendepunkt von $\log(\langle T_1 \rangle)$ des hydratisierten CPCs, im Nebensbild die zugehörigen Skalierungsfaktoren T_0 . Die Relaxationszeiten von Elastin und Collagen wurden zusätzlich vertikal verschoben, um unterschiedliche Larmorfrequenzen der Messungen zu berücksichtigen.

Die Änderung in den Korrelationszeiten wird im gleichen Temperaturbereich wie die Änderung der Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit des Proteinprozesses beobachtet. Die mittlere Spin-Gitter-Relaxationszeit der Proteinstufe ist in Bild 7.24 zusammen mit den Proteinstufen aus ²H-NMR-Untersuchungen an hydratisiertem c-Phycocyanin ($h = 0,3$),¹⁴⁵ Elastin ($h = 0,43$),¹⁶ Collagen ($h = 0,25$)¹⁶ sowie an einer 66 Mol-%-Wasser-DMSO-Mischung an Myoglobin ($s = 0,3$)⁴⁶² und Elastin ($s = 0,3$)⁴⁶¹ aufgetragen. Die Temperatur T_0 wird durch den Beginn der Abweichung des Temperaturverlaufs vom Tieftemperaturverhalten festgelegt. Alle gezeigten Systemen folgen für hohe Temperaturen dem gleichen Verlauf und zeigen eine Stufe im Temperaturverlauf im Bereich $T/T_0 = 0,9 - 1$, die im trockenen Protein nicht auftritt. Die Werte des hydratisierten Elastins und des Myoglobins sind

Proteinstufe der
Spin-Gitter-
Relaxation

im Tieftemperaturbereich ($T/T_0 > 1,2$) etwas geringer als die der anderen Systeme. Es ist möglich, dass Unterschiede im Tieftemperaturverhalten auf den Einfluss des ^2H -Austauschs zwischen Protein und Wasser zurückzuführen sind, dessen Austauschraten bei Raumtemperatur auf einer Zeitskala mehrerer Sekunden ist.^{475,476} Ein ähnlicher Übergang wird neben den hier gezeigten Systemen auch in weiteren ^2H -NMR-Untersuchungen anderer Wasser-Protein-Systeme beobachtet.^{146,477–479} Verschiedene Studien an Proteinsystemen kamen zudem zu dem Befund, dass sich oberhalb von circa 200 K die Bewegungsamplitude von Proteinrückgrat und -seitenketten erhöht.^{40,125,145,149,479,480} Der Übergang findet für das Phycocyanin im Vergleich zu den übrigen Protein bei einer niedrigeren Temperatur statt. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass hier perdeutiertes Phycocyanin untersucht wurde. Dadurch sind Seitenketten aller Aminosäuren in diesem Protein sichtbar, die durch die fehlende Möglichkeit des ^1H - ^2H -Austauschs in den anderen Systemen unsichtbar sind. Im Temperaturbereich, in dem die Änderung der Relaxationszeit einsetzt, wird in Neutronenstreuuntersuchungen ein dynamischer Übergang beobachtet^{23,361,481} (vgl. Abschnitt 5). In diesem Zusammenhang lässt sich die Änderung der Temperaturabhängigkeit als dynamischer Übergang interpretieren, der auf einsetzende Proteindynamik hinweist. Die gleichzeitige Beobachtung von Änderungen in der Protein- und der Wasserdynamik weist deutlich darauf hin, dass beide Komponenten sich wechselseitig beeinflussen.

Zusammenfassung der Wasserdynamik

Die Wasserdynamik wurde mithilfe von ^2H -NMR-Experimenten charakterisiert, die gemeinsam mit den Ergebnissen aus dielektrischer Spektroskopie einen dynamischen Bereich von Pikosekunden bis Sekunden abdecken. Beide Mischungssysteme zeigen ein qualitativ ähnliches Verhalten und folgen für $T \lesssim 210\text{ K}$ der 66 Mol.-%-Bulkmischung. Im Tieftemperaturbereich wird anhand von Stimulierten-Echo-Experimenten eine breite Verteilung von Korrelationszeiten mit arrheniusförmiger Temperaturabhängigkeit beobachtet, die in dielektrischer Spektroskopie nicht gefunden wird. Dieser Unterschied zwischen beiden Messmethoden ist auch von anderen wasserhaltigen Systemen bekannt. Für Temperaturen $T \gtrsim 210\text{ K}$ folgt die Temperaturabhängigkeit des Wassers in den Proteinsystemen nicht länger der des Bulksystems. Die Änderung in den Korrelationszeiten fällt mit einer Änderung in den Spin-Gitter-Relaxationszeiten des Proteins zusammen. Durch den Vergleich mit Untersuchungen anderer Proteinsysteme lässt sich die Veränderung in der Proteinkomponente als Zeichen eines dynamischen Übergangs interpretieren. Das weist darauf hin, dass das Protein durch seine Dynamik die Verteilung, die der Wasserdynamik zugrunde liegt, verändert. Ein solcher Einfluss auf die Lösungsmitteldynamik ist im deutlichen Widerspruch zum Slaving-Modell von Frauenfelder et al., dass von einer einseitigen Beeinflussung durch das Lösungsmittel ausgeht.

7.4 ^2H -NMR: DMSO-Dynamik

Nach einem globalen Überblick über die Dynamik mit dielektrischer Spektroskopie und einer gezielten Untersuchung der Wasserdynamik in den vorigen Abschnitten soll nun versucht werden, die Dynamik der DMSO-Komponente mithilfe ^2H -NMR-Methoden zu charakterisieren. Die Deuterierung des DMSO an den Methylgruppen hat im Vergleich mit Wasser einerseits den Vorteil, dass kein Austausch mit dem Protein stattfindet, andererseits den Nachteil, dass zugleich die Bewegung des Gesamtmoleküls und die Rotation der Methylgruppen betrachtet wird.

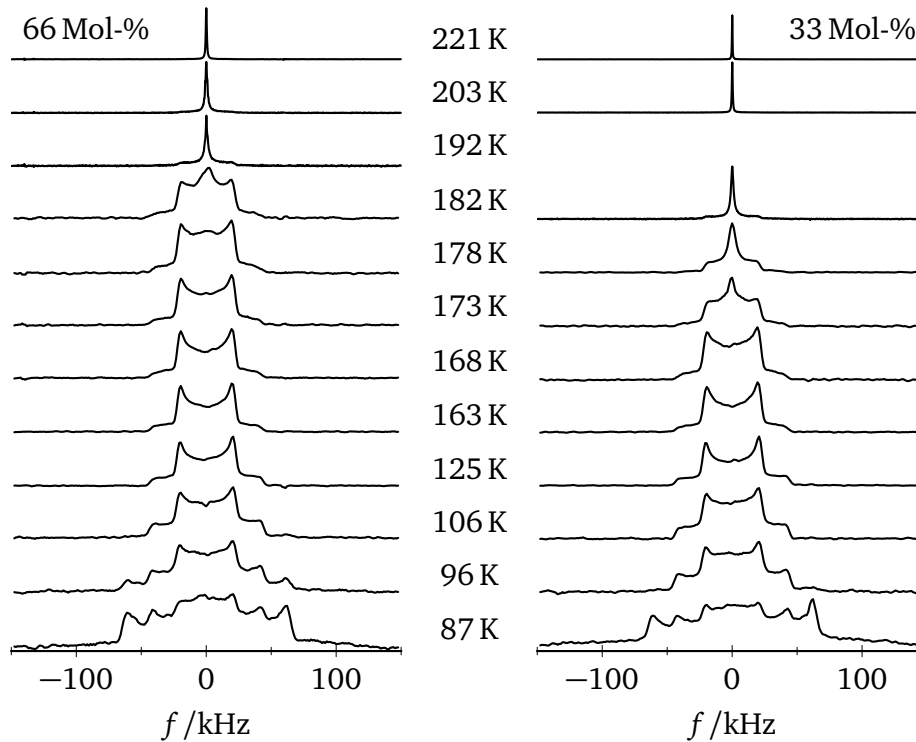


Bild 7.25: ^2H -NMR-Spektren von DMSO- d_6 .

Im Gegensatz zur bisherigen Struktur der Diskussion von NMR-Daten wird als erstes nicht die Spin-Gitter-Relaxation, sondern zunächst die Temperaturabhängigkeit der Linienform untersucht. Die Spektren des DMSO- d_6 beider Mischungen sind für Temperaturen zwischen 87 K und 221 K in Bild 7.25 aufgetragen. Beide Proben zeigen qualitativ ein ähnliches dynamisches Verhalten und weisen im Temperaturbereich zwischen 100 K und 300 K zwei Linienformübergänge auf. Ausgehend von hohen Temperaturen, wo eine Lorentzlinie beobachtet wird, tritt bei Abkühlung eine Überlagerung der Lorentzlinie und einer schmalen Pakekomponente mit Kopplungskonstanten $\delta = 2\pi \cdot 40 \text{ kHz}$ auf. Der erste Linienformübergang ist in der 33 Mol-%-Probe zwischen 200 K und 218 K zu sehen. In der 66 Mol-%-Probe ist der

Linienform

Linienformübergang um etwa 10 K zu höheren Temperaturen verschoben. Dieser Übergang ist eine Folge des Überkreuzens der Korrelationszeit der isotropen Bewegung des Gesamtmoleküls und dem experimentellen Zeitfenster im Mikrosekundenbereich. Die bei diesen Temperaturen noch schnelle Rotation der Methylgruppen

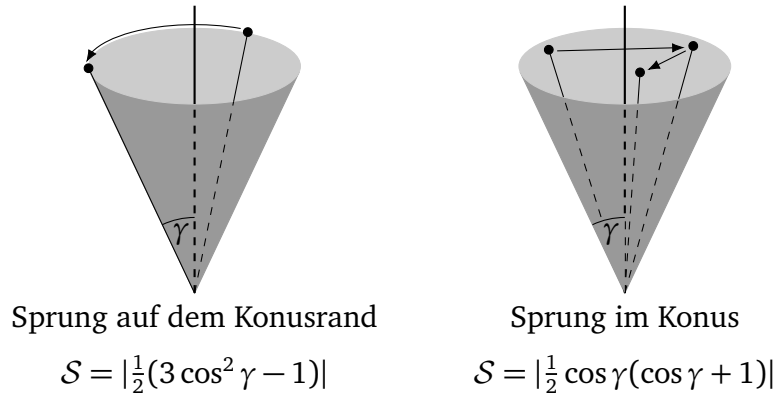


Bild 7.26: Schema eines Zufallssprungs auf dem Konusrand und eines Zufallssprungs im Konus mit halben Öffnungswinkel γ .

um die C_3 -Symmetrieachse führt zu einer bewegungsverschmälerten Kopplungskonstanten.⁴⁸² Die Methylgruppenrotation lässt sich als Sprung der C–D-Bindung auf einem Konusrand repräsentieren. Die reduzierte Kopplungskonstante $\langle \delta \rangle$ ist in diesem Fall durch

$$S = \frac{\langle \delta \rangle}{\delta} = \left| \frac{1}{2} (3 \cos^2 \gamma - 1) \right| \quad (7.17)$$

gegeben, wobei die Skalierung S vom halben Öffnungswinkel γ des Konus bestimmt wird (Bild 7.26). Mit den beobachteten Werten $\langle \delta \rangle = 2\pi \cdot 40 \text{ kHz}$ und $\delta = 2\pi \cdot 122 \text{ kHz}$ ergibt sich ein Öffnungswinkel von $\chi = 70,2^\circ$.[‡] Dieser Öffnungswinkel stimmt sehr gut mit dem Wert von $70,9^\circ$ überein, der bei einer perfekt tetraedrischen Anordnung der Atome auftritt. Unterhalb von 173 K ist in beiden Proben hauptsächlich das durch Methylgruppenrotation verschmälerte Pakespektrum zu beobachten. Erst bei weiterer Abkühlung auf unter 106 K ist auch die Korrelationszeit der anisotropen Bewegung auf der Zeitskala des Linienformübergangs und eine Überlagerung mit einem komplett statischen Pakespektrum mit Kopplungskonstanten $\delta = 2\pi \cdot 122 \text{ kHz}$ ist zu sehen. Auch dieser Übergang beginnt in der 66 Mol.-%-Probe bei einer höheren Temperatur, wie beim Vergleich der Spektren bei 96 K deutlich zu erkennen ist. Bei beiden Proben ist der Linienformübergang bei der niedrigsten Temperatur von $T = 87 \text{ K}$ noch nicht abgeschlossen. Aufgrund der

[‡]Eine weitere Lösung ist $\chi = 42^\circ$, da durch die Betragsbildung zwei Lösungen möglich sind. Für die Anordnung der Atome in der Methylgruppe ist der Winkel von $70,2^\circ$ der wahrscheinlichere Öffnungswinkel des Bewegungskonus.

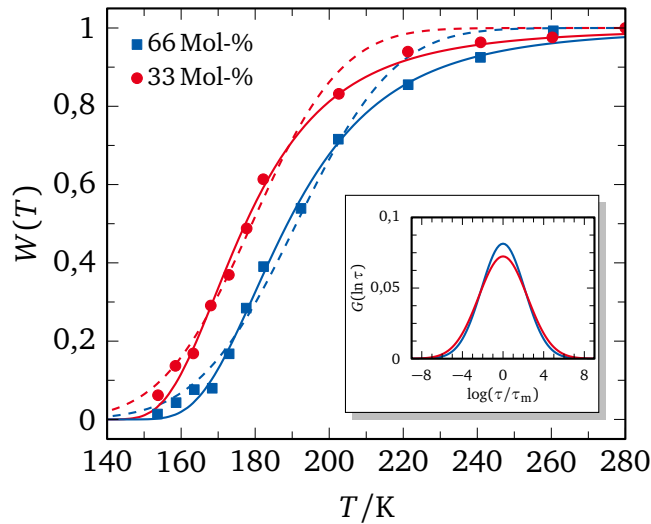


Bild 7.27: Temperaturabhängigkeit des Gewichtungsfaktors $W(T)$ von DMSO- d_6 . Gestrichelte Linien sind Anpassung nach Gleichung (3.67), durchgezogene Linien nach Gleichung (7.18). Im Nebenbild sind die aus der Anpassung gewonnenen die Verteilung von Korrelationszeiten dargestellt.

Kühlung mit flüssigem Stickstoff sind tiefere Temperaturen nicht erreichbar, sodass eine Auswertung des Tieftemperaturübergangs nicht möglich ist.

Die Überlagerung aus Lorentzlinie und Pakespektrum im Bereich des Linienformübergangs im Hochtemperaturbereich weist auf eine breite Korrelationszeitenverteilung hin. Der Anteil der Lorentzlinie $W(T)$ an der Gesamtfläche des Spektrums ist in Bild 7.27 in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Beide Mischungsverhältnisse zeigen eine ähnliche Temperaturabhängigkeit des Gewichtungsfaktors, das 33 Mol-%-System ist aber zu höheren Temperaturen verschoben. Der Gewichtungsfaktor der 33 Mol-%-Mischung ist bei einer Temperatur von 190 K auf die Hälfte abgefallen, für die 66 Mol-%-Mischung geschieht dies erst bei 178 K. Eine Anpassung mit Gleichung (3.69) beschreibt den Kurvenverlauf unzureichend, insbesondere ist der beobachtete Gewichtungsfaktor oberhalb von 200 K niedriger als das Ergebnis der Anpassung.

Eine Beschreibung des Gewichtungsfaktors durch Gleichung (3.69) ist unter der Annahme einer temperaturunabhängigen Energieverteilung und einer arrheniusartigen Temperaturabhängigkeit möglich.²³⁷ Bei einer temperaturunabhängigen Breite der Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ ist der Gewichtungsfaktor bei einer Vogel-Fulcher-Tammann-Funktion $\tau_m = \tau_0 \exp(B/(T - T_0))$ hingegen durch

Gewichtungs-
faktor für
 $G(\ln \tau)$

$$W(T) = \frac{1}{2} \operatorname{erfc} \left[\frac{\ln(\delta \tau_0) + B/(T - T_0)}{\sqrt{2}\sigma} \right] \quad (7.18)$$

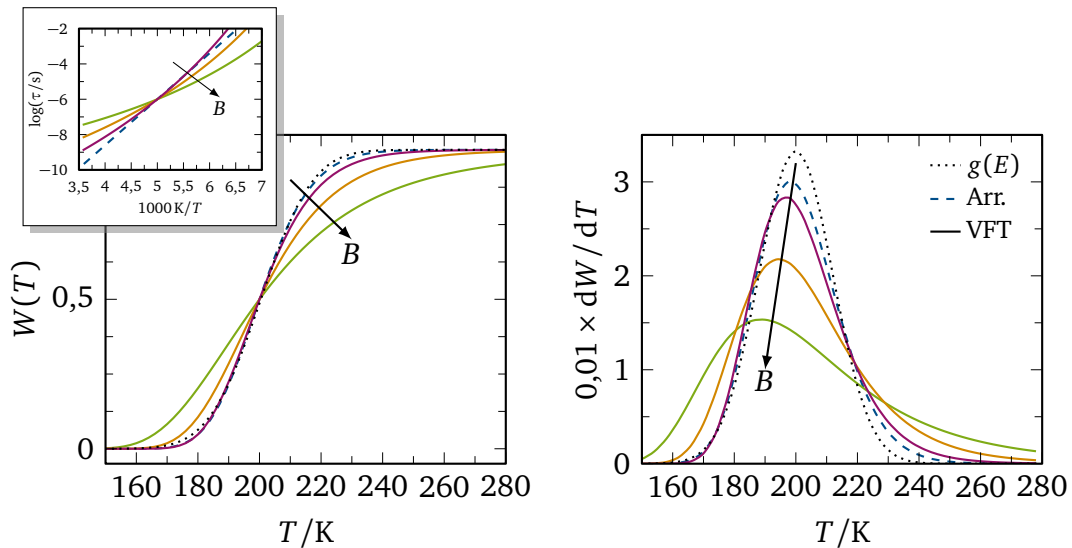


Bild 7.28: Temperaturabhängigkeit des Gewichtungsfaktors $W(T)$ und der Ableitung dW/dT bei temperaturunabhängiger Breite der Verteilung $G(\ln\tau)$ mit $\sigma = 2$. Die Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeit ist gegeben durch Arrhenius-Funktion $\tau \sim \exp(6000 K/T)$ (gestrichelte Linie) bzw. VFT-Funktion $\tau \sim \exp[B/(T - 80 K)]$ mit $B = 1000 K$, $1500 K$ und $2000 K$, die im Nebenbild dargestellt sind. Die gepunktete Kurve ist eine Anpassung von Gleichung (3.69) an die gestrichelte Linie.

mit der komplementären Fehlerfunktion $\operatorname{erfc}(x) = 1 - \operatorname{erf}(x) = 2/\sqrt{\pi} \int_x^\infty e^{-t^2} dt$ gegeben. Der Einfluss der Temperaturabhängigkeit $\tau(T)$ auf die Kurvenform ist beispielhaft für verschiedene VFT-Funktionen in Bild 7.28 dargestellt. Die Vorfaktoren τ_0 sind so gewählt, dass die Bedingung $\tau_m(200 K) = 10^{-6} s$ erfüllt ist. Bei gleichbleibender Verteilungsbreite $\sigma = 2$ zeigt der Gewichtungsfaktor eine Abhängigkeit der Kurve vom unterliegenden Temperaturverlauf. Mit stärkerer Abweichung vom Arrhenius-Verhalten verbreitert sich der Temperaturbereich, in dem der Linienformübergang stattfindet. Zusätzlich verschiebt sich der Wendepunkt des Gewichtungsfaktors zu niedrigeren Temperaturen und ist schwächer temperaturabhängig. Unverändert ist hingegen die Temperatur, für die $W(T) = 0,5$ bzw. $\tau_m = 1/\delta$ gilt.

Da die Parameter der Anpassung des Gewichtungsfaktors nicht unabhängig voneinander sind, wurde die Temperaturabhängigkeit übernommen, die zur Beschreibung der Daten aus dielektrischen Spektroskopie und der D_2O -Dynamik in Bild 7.21 gefunden wurde. Mit den Parametern $\tau_0 = 9,08 \cdot 10^{-14}$ und $\sigma = 5,51$ für die 33 Mol-%-Mischung bzw. $\tau_0 = 6,31 \cdot 10^{-13}$ und $\sigma = 4,90$ für die 66 Mol-%-Mischung ist eine gute Anpassung des Kurvenverlaufs beider untersuchter Systeme möglich. Die gewonnenen Verteilungsbreiten weisen auf eine stark heterogene Umgebung hin, die

DMSO-Moleküle während ihrer Reorientierung erfahren. Im Gegensatz zur Dynamik der Wassermoleküle, die in diesem Temperaturbereich nur schwach von der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängt (Bild 7.19), zeigt die DMSO-Dynamik eine stärkere Abhängigkeit (vgl. Bild 7.27).

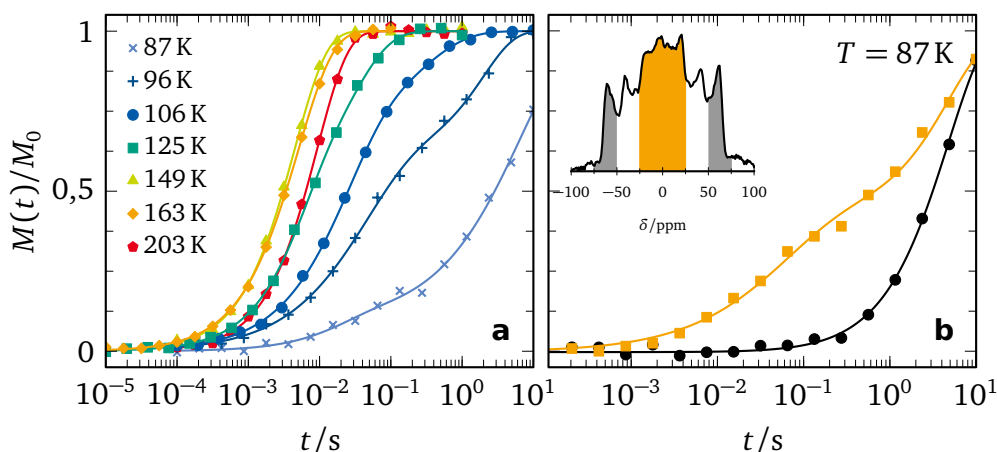


Bild 7.29: (a) Magnetisierungskurven von DMSO-d₆ des 66 Mol.-%-Systems für ausgewählte Temperaturen. (b) Magnetisierungsaufbau bei Auswertung unterschiedlicher spektraler Bereiche, die im Nebenbild eingezeichnet sind.

Im Tieftemperaturbereich unterhalb von 150 K lassen sich die Messkurven nicht mehr durch eine einzige gestreckte Exponentialfunktion beschreiben. Ein bimodaler Magnetisierungsaufbau wurde ebenfalls für Methylgruppen in Propylencarbonat gefunden.⁴⁸³ Eine abrupte Erhöhung der Spin-Gitter-Relaxation im Temperaturbereich des Linienformübergangs wurde auch in ²H-NMR-Experimenten an Methylgruppen im Protein HP36 beobachtet.⁴⁸⁴ Die Zweistufigkeit setzt mit dem Auftreten der Zweikomponentenspektren ein, wie anhand der Auswertung unterschiedlicher spektraler Bereiche offensichtlich wird. Die langsame Magnetisierungsstufe wird im statischen Anteil des Spektrums gefunden, die schnelle Stufe im bewegungsver schmälerten Anteil (Bild 7.25b).

Spin-Gitter-Relaxation

Die Verknüpfung der Magnetisierungsstufen mit den unterschiedlichen Komponenten des Spektrums legt nahe, dass wie für Zweikomponentenspektren die Ursache der Bimodalität in der breiten Verteilung von Korrelationszeiten zu suchen ist. Für den Fall, dass der beobachtete Magnetisierungsaufbau durch eine Superposition exponentieller Prozesse gegeben ist, folgt der Magnetisierungsaufbau

Biexponentialität der Magnetisierung

$$\frac{M(t)}{M_0} = 1 - \int_{-\infty}^{\infty} G(\ln \tau) \exp\left[-\frac{t}{T_1(\tau)}\right] d\ln \tau, \quad (7.19)$$

wobei die Relaxationsrate in ²H-NMR-Experimenten über die BPP-Gleichung (3.60)

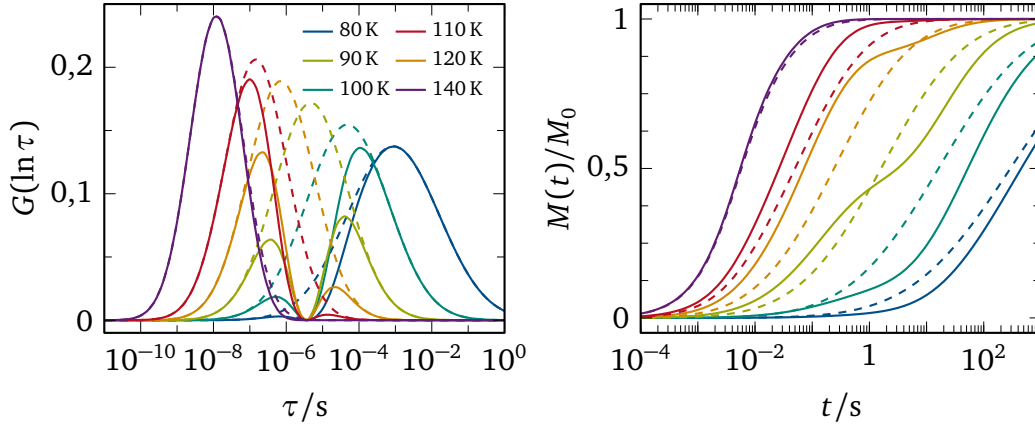


Bild 7.30: (a) Korrelationszeitenverteilung $G(\ln \tau)$ und (b) Magnetisierungsaufbau $M(t)$ für den Fall einer Verteilung von Aktivierungsenergien $g(E)$ ohne Berücksichtigung eines Reduktionsfaktors (gestrichelt) und mit Berücksichtigung eines Reduktionsfaktors (durchgezogene Linie).

$$T_1^{-1}(\tau) = \frac{2}{15} \delta^2 \left[\frac{\tau}{1 + (\omega\tau)^2} + \frac{4\tau}{1 + 4(\omega\tau)^2} \right] \quad (7.20)$$

mit der Korrelationszeit τ verknüpft ist.[§] Der Ansatz, die Spin-Gitter-Relaxation direkt mittels der Verteilung von Korrelationszeiten zu beschreiben, wurde bereits zur Bestimmung von Aktivierungsenergien in glasbildenden Systemen angewendet.⁴⁸⁵ Für die hier betrachteten Systeme muss jedoch zusätzlich berücksichtigt werden, dass bei der Signalaufnahme mit einem Festkörperecho Prozesse, die auf der Zeitskala des Impulsabstands t_p stattfindet, nicht refokussiert werden kann.²³³ Die unvollständige Refokussierung des Signals lässt sich im Magnetisierungsaufbau durch den Reduktionsfaktors $R(\ln \tau)$ als

$$\frac{M(t)}{M_0} = 1 - \int_{-\infty}^{\infty} G(\ln \tau) R(\ln \tau) \exp\left[-\frac{t}{T_1(\tau)}\right] d\ln \tau, \quad (7.21)$$

berücksichtigen.⁴⁸⁶ Die möglichen Auswirkungen des Reduktionsfaktors auf die Aufbaukurven sind in Bild 7.30 anhand eines Beispiels abgebildet. Aus der Verteilung von Aktivierungsenergien $g(E)$ mit $E_m = 0,17$ eV und $\sigma = 0,020$ eV (den Werten des 33 Mol-%-Systems aus der Analyse des T_1 -Minimums) folgen ohne Reduktionsfaktor die Korrelationszeitenverteilung $G(\ln \tau)$ und die Magnetisierungskurve $M(t)$ (gestrichelte Linien). Mit einem Reduktionsfaktor

[§]Eigentlich müsste für schnelle Anteile der Ordnungsparameter S berücksichtigt werden (vgl. Gleichung (7.25)), der Einfluss auf die Aufbaukurve hat sich aber als vernachlässigbar herausgestellt.

$$R(\ln \tau) = 1 - \exp \left\{ -\frac{\ln(2\pi \cdot 122 \text{ kHz} \cdot \tau)^2}{2 \cdot 1^2} \right\}, \quad (7.22)$$

dessen Form durch die statische Kopplungskonstante $\delta = 2\pi \cdot 122 \text{ kHz}$ und einer Breite von $\alpha = 1$ bestimmt wird, weichen sowohl Verteilung als auch Aufbaukurve vom Fall ohne Reduktionsfaktor ab (durchgezogenen Linien). In den Grenzfällen, wenn ein Großteil der Verteilung schnell bzw. langsam bezüglich des Minimums des Reduktionsfaktors ist, werden Aufbaukurven mit kürzeren bzw. längeren Relaxationszeiten als in den ungestörten Fällen beobachtet. Für Temperaturen, für die auf beiden Seiten des Reduktionsfaktors Beiträge der Korrelationszeitenverteilung existieren, wird entsprechend ein zweistufiger Aufbau beobachtet. Obwohl dieses Beispiel den Eindruck vermitteln kann, mit Gleichung (7.21) die Messkurven beschreiben zu können, gibt es leider zwei Punkte, die dem entgegen stehen. Zum einen muss die Form des Reduktionsfaktors und der Energieverteilung bekannt sein, der von der Art der Bewegung und im Fall einer Energieverteilung auch temperaturabhängig ist. Zum anderen können Austauscheffekte wie Spindiffusion auftreten, die die Eins-zu-eins-Beziehung zwischen T_1 und τ infrage stellen. Glücklicherweise ist der Einfluss des Reduktionsfaktors im Bereich des T_1 -Minimums vernachlässigbar (höchste gezeigte Temperatur in Bild 7.30), sodass dessen Auswertung unbeeinflusst bleibt. Niedrigere Temperaturen werden im Folgenden zwar als bimodale Magnetisierungskurven angepasst, in der weiteren Diskussion aber nicht berücksichtigt.

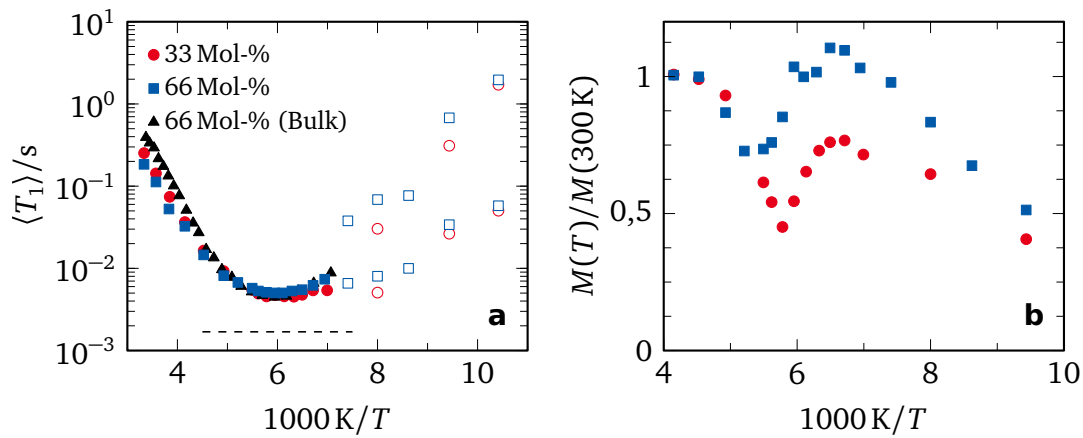


Bild 7.31: Temperaturabhängigkeit des Streckungsparameters β (a) und der Gleichgewichtsmagnetisierung M (b) von DMSO- d_6 der 33 Mol-%- und 66 Mol-%-Probe. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die erwartete Höhe des Minimums bei einer exponentiellen Korrelationsfunktion.

Die aus der Anpassung der Magnetisierungskurven gewonnenen Spin-Gitter-Relaxationszeiten $\langle T_1 \rangle$ und Gleichgewichtsmagnetisierungen M sind in Bild 7.31 über

Parameter der
Spin-Gitter-
Relaxation

die inverse Temperatur aufgetragen. Der Magnetisierungsaufbau ist für beide Mischungsverhältnisse im Temperaturbereich der einstufigen Auswertung nahezu exponentiell, im Bereich der zweistufigen Auswertung fallen die Streckungsparameter beider Komponenten auf $\beta \approx 0,75$ ab. Die Spin-Gitter-Relaxationszeiten (Bild 7.31a) sind dominiert von der Dynamik der Methylgruppenrotation. Die Verteilung von Aktivierungsenergien, die der Methylgruppenrotation zugrunde liegt, erhöht die beobachteten Minima im Vergleich zum Wert, der für Relaxation ohne Verteilung erwartet wird. Das Minimum der Relaxationszeiten ist sowohl in der Höhe als auch in der Temperatur nur schwach vom betrachteten System abhängig. Der Unterschied zwischen Protein- und Bulksystem ist gering, die 66 Mol-%-Systeme durchlaufen ein Minimum von etwa 4,8 ms bei 167 K. Das 33 Mol-%-System ist mit einem Minimum von 4,4 ms bei 173 K in Höhe und Temperatur etwas verschoben. Für Temperaturen oberhalb von 210 K werden Unterschiede zwischen den verschiedenen Systemen sichtbar. Die Proteinsysteme weisen kürzere Relaxationszeiten auf, was auf eine veränderte Dynamik der Gesamtmolekülbewegung zurückzuführen ist. Die Gleichgewichtsmagnetisierung beider Proteinsysteme zeigt in Übereinstimmung mit den beobachteten Linienformübergängen in Bild 7.25 in zwei Temperaturbereichen eine reduzierte Intensität. Die Signalreduktion im Hochtemperaturbereich, die dem Linienformübergang der Gesamtmolekülbewegung zugeordnet werden kann, ist wie bereits der Gewichtungsfaktor in Bild 7.27 abhängig vom Mischungsverhältnis. Das Minimum der 66 Mol-%-Mischung liegt bei 192 K, das der 33 Mol-%-Mischung bei 173 K, was für beide Systeme sehr gut mit den Temperaturen übereinstimmt, für die der zugehörige Gewichtungsfaktor die Bedingung $\tau = 1/\langle\delta\rangle$ erfüllt. Die Höhe des Signalminimums liegt für 33 Mol-%-System höher als für das 66 Mol-%-System. Allerdings sitzt bereits bei diesen Temperaturen die Signalreduktion durch die Dynamik der Methylgruppen ein, die bis zu niedrigsten beobachteten Temperatur noch nicht vollständig das experimentelle Zeitfenster durchlaufen hat. Die Signalreduktion stärkt den Befund aus der Analyse des Gewichtungsfaktors, dass DMSO-Dynamik im Temperaturbereich des Linienformübergangs von der Lösungsmittelzusammensetzung beeinflusst ist. Der Vergleich der Minimumshöhen kann wegen des Überlapps mit der Signalreduktion durch die Methylgruppenrotation nicht dazu herangezogen werden, ob sich die Korrelationszeitenverteilungen der beiden Systeme in ihrer Breite unterscheiden.

Relaxation bei
anisotroper
Bewegung

Die beobachteten Spin-Gitter-Relaxationszeiten werden oberhalb von $T \approx 210\text{ K}$ nicht mehr ausschließlich durch die Methylgruppenrotation bestimmt, sondern ebenfalls durch Bewegung des gesamten Moleküls beeinflusst. Zur Beschreibung der Relaxationszeiten wird dem Ansatz von Williams und Watts⁴⁸⁷ folgend die Korrelationsfunktion

$$F_{\text{ges}}(t) = [S^2 + (1 - S^2)F_{\text{met}}(t)]F_{\text{mol}}(t) \quad (7.23)$$

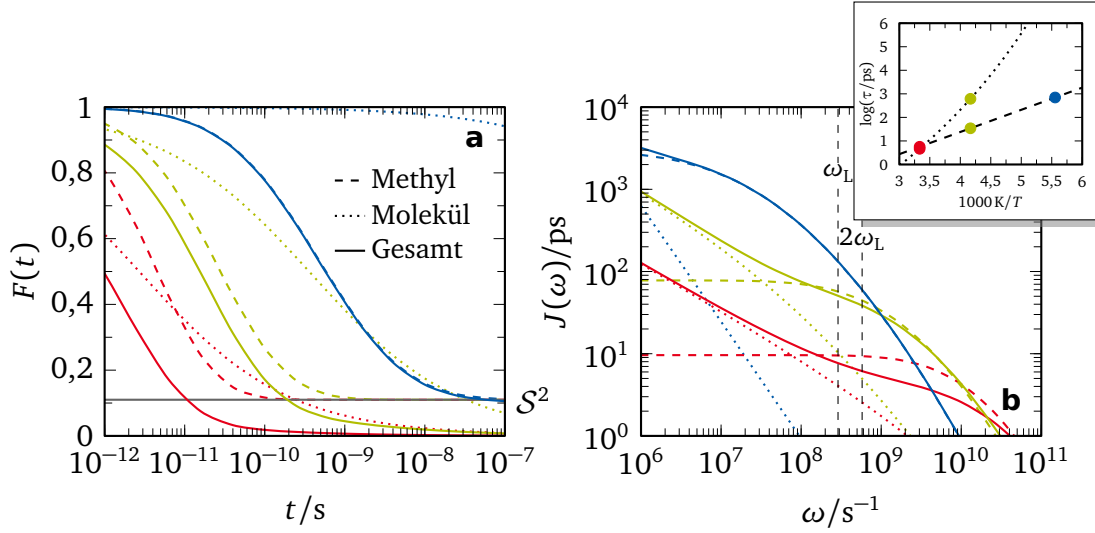


Bild 7.32: (a) Korrelationsabfall $F(t)$ und (b) spektrale Dichte $J(\omega)$ nach Gleichung (7.23) bei verschiedenen Temperaturen mit Beträgen einer Methylgruppenrotation (gestrichelt) und der Bewegung des gesamten Moleküls (gepunktet). Im Nebenbild ist die verwendete Temperaturabhängigkeit dargestellt.

als Ausgangspunkt verwendet. In dieser Funktion repräsentiert $F_{\text{mol}}(t)$ die Bewegung des Gesamtmoleküls und $F_{\text{met}}(t)$ die Methylgruppenrotation (Bild 7.32a). Aus der zugehörigen spektrale Dichte $J_{\text{ges}}(\omega)$ (Bild 7.32b) und Nutzung der BPP-Gleichung (3.60) ist die Relaxationsrate gegeben durch

$$\begin{aligned} \langle T_1^{-1} \rangle = & \frac{2}{15} \delta^2 S^2 [J_{\text{iso}}(\omega_L) + 4J_{\text{iso}}(2\omega_L)] \\ & + \frac{2}{15} \delta^2 (1 - S^2) [J_{\text{m,i}}(\omega_L) + 4J_{\text{m,i}}(2\omega_L)] . \end{aligned} \quad (7.24)$$

Die spektrale Dichte $J_{\text{m,i}}(\omega) = J_{\text{met}}(\omega) \otimes J_{\text{iso}}(\omega)$ ist bestimmt durch die Faltung der spektralen Dichte beider Prozesse. Um zur Temperaturabhängigkeit der Gesamtbeziehung zu gelangen, wird zunächst die Methylgruppenrotation charakterisiert.

Im Temperaturbereich um das beobachtete T_1 -Minimum ist die Dynamik des Gesamtmoleküls um mehrere Größenordnung langsamer als die der Methylgruppenrotation und kann vernachlässigt werden. Gleichung (7.24) vereinfacht sich dann zu

$$\langle T_1^{-1} \rangle = \frac{2}{15} \delta^2 (1 - S^2) [J_{\text{met}}(\omega_L, \tau_{\text{met}}) + 4J_{\text{met}}(2\omega_L, \tau_{\text{met}})] \quad (7.25)$$

und erlaubt eine Bestimmung der spektralen Dichte $J_{\text{met}}(\omega)$. Wie bereits in der Beschreibung der Methylgruppendynamik in Abschnitt 5 wird von einer Gaußverteilung von Aktivierungsenergien

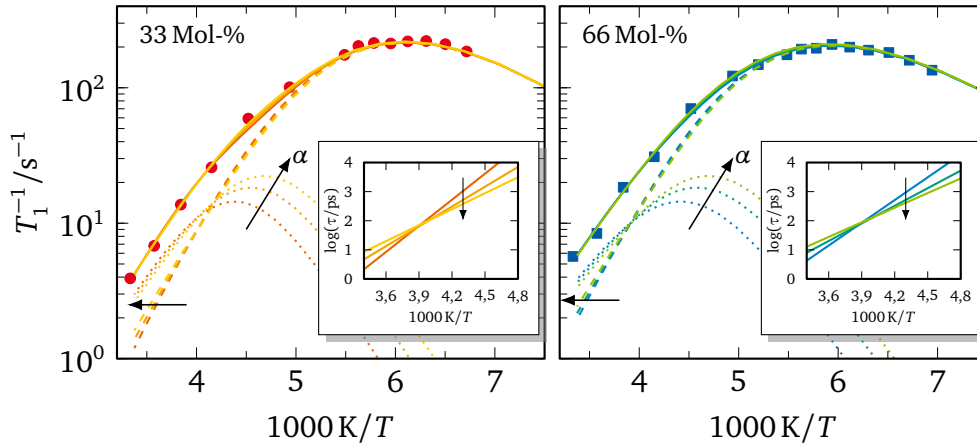


Bild 7.33: Anpassung der inversen Relaxationszeiten von DMSO nach Gleichung (7.24) für Breitenparameter $\alpha = 0,4, 0,5$ und $0,6$ (durchgezogene Linien). Die Beiträge durch Reorientierung des Gesamtmoleküls und durch Methylgruppenrotation sind als gepunktete bzw. gestrichelte Linien abgebildet. Im Nebenbild ist die Temperaturabhängigkeit der Gesamtmolekülbewegung für die betrachteten Breitenparameter abgebildet. Pfeile zeigen entlang der Erhöhung der Breitenparameter.

$$g(E) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{(E - E_m)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (7.26)$$

mit mittlerer Energie E_m und Verteilungsbreite σ ausgegangen. Zusammen mit der Temperaturabhängigkeit der Methylgruppen, die einem Arrhenius-Gesetz

$$\tau_{\text{met}}(E, T) = \tau_0 \exp\left(\frac{E}{k_B T}\right) \quad (7.27)$$

folgt,³⁷³ lässt sich die spektrale Dichte durch

$$J_{\text{met}}(\omega, T) = \int_0^\infty g(E) \frac{\tau_{\text{met}}(E, T)}{1 + [\omega \tau_{\text{met}}(E, T)]^2} dE \quad (7.28)$$

ausdrücken. Anhand der Relaxationszeiten im Temperaturbereich zwischen 150 K und 185 K lassen sich die freien Parameter τ_0 , E_m und σ festlegen, die für beide Mischungen in Tabelle 7.4 aufgelistet sind. Die Aktivierungsenergien und Verteilungsbreiten stimmen mit Werten, die typischerweise in der Literatur aufgelistet werden, gut überein.^{280,483,488}

Für eine etwas einfachere Beschreibung der Molekülbewegung werden zwei Annahmen getroffen: Die erste Annahme ist, dass der DMSO-Dynamik wie der Wasserdyn-

Tabelle 7.4: Parameter aus der Anpassung der DMSO-Messungen

	$\tau_0/10^{-15}\text{ s}$	E_m/eV	σ/eV
66 Mol-%	9,9	0,17	0,024
33 Mol-%	7,0	0,17	0,020

namik eine Cole-Cole-Funktion als spektrale Dichte zugrunde liegt. Zudem wird die Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten durch eine Arrhenius-Funktion genähert. Die Anpassung mit Gleichung (7.24) repräsentiert den Temperaturverlauf der Spin-Gitter-Relaxation sehr gut (Bild 7.33). Allerdings zeigt dieses Bild auch, dass der Breitenparameter α und die Parameter der Temperaturabhängigkeit nicht unabhängig voneinander zu bestimmen sind. Da weder Breitenparameter noch die Arrhenius-Funktion a priori bekannt sind, ist eine eindeutige Parametrisierung nicht möglich. Aber obwohl der Verlauf der Arrhenius-Funktion stark variiert, wird in allen Fällen bei einer Temperatur von $T \approx 260\text{ K}$ eine Korrelationszeit von $\tau \approx 8 \cdot 10^{-11}\text{ s}$ durchlaufen (Nebenbilder in Bild 7.33). Somit ist zumindest möglich, die Zeitskala, auf der sich die Moleküldynamik bewegt, abzuschätzen.

Die Ergebnisse von ²H-NMR-Messungen an DMSO können bezüglich der Reorientierung des Gesamtmoleküls nur an wenigen Punkten ohne äußere Informationen quantitativ interpretiert werden. Die Temperaturabhängigkeit des Linienformübergangs zwischen 170 K und 190 K konnte mit einer Verteilung von Korrelationszeiten mit temperaturunabhängiger Breite beschrieben werden. Zusätzlich wurde eine Abhängigkeit der Moleküldynamik von der Zusammensetzung des Solvens gefunden. Die Spin-Gitter-Relaxation unterhalb von 200 K wird ausschließlich durch die Rotation der Methylgruppen bestimmt. Eine beobachtete Zweistufigkeit des Magnetisierungsaufbau kann darauf zurückgeführt werden, dass Teile der unterliegenden Verteilung von Korrelationszeiten mit der experimentellen Zeitskala interferieren und nicht zum detektierten Signal beitragen. Für Temperaturen über 200 K wird die Spin-Gitter-Relaxation zusätzlich durch die Reorientierung des Gesamtmoleküls beeinflusst. Eine quantitativ eindeutige Auswertung dieses Temperaturbereichs ist nicht möglich, aber Unterschiede zwischen Protein- und Bulksystem zeigen einen Einfluss des Proteins auch auf die Dynamik des DMSO.

Fazit zur DMSO-Dynamik

7.5 ¹³C-NMR-Spektren von Lysozym-Wasser/DMSO

Das ¹³C-CPMAS-Spektrum von Lysozym zeigt die bereits von Elastin (Abschnitt 6.1) bekannte Zuordnung der Carbonylgruppe bei 175 ppm, aromatische Bindungen im Bereich von etwa 125 ppm und aliphatische Bindungen von 70 ppm bis 10 ppm. Letztere lassen sich wiederum in drei Bereiche unterteilen: Der Signalbeitrag von

Zuordnung von Resonanzen

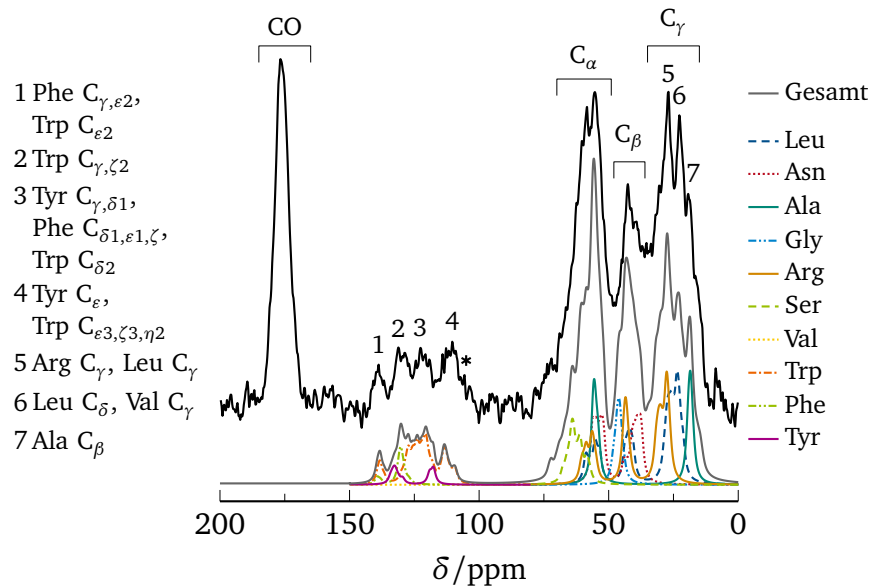


Bild 7.34: Zuordnung von Resonanzen am ^{13}C -CPMAS-Spektrum von hydratisiertem Lysozym ($h = 0,3$) nach Davis⁴⁸⁹ für aromatische Bindungen und Wang et al.⁴⁹⁰ für aliphatische Bindungen.

C_{α} -Gruppen bei $\delta \approx 60$ ppm, von C_{β} -Gruppen bei $\delta \approx 40$ ppm und von Kohlenstoffen in Seitenketten (C_{γ}) bei $\delta \approx 25$ ppm. Anders als im Fall von Elastin ist die Zusammensetzung der Primärstruktur nicht durch einige wenige Aminosäuren dominiert (Bild D.1). Entsprechend überlagern sich die Resonanzen im ^{13}C -Spektrum des Lysozyms und eine Zuordnung zwischen Resonanzlinie und Kohlenstoffbindung ist schwieriger. Im hydratisierten System ist die Zuordnung von Signalen aufgrund einer besseren Auflösung für einige Kohlenstoffbindungen möglich (Bild 7.34). Dafür wurden für den aliphatischen Bereich die Literaturwerte von Wang et al.,⁴⁹⁰ für aromatische Bindungen die von Davis⁴⁸⁹ übernommen, die als Lorentzlinien mit einer Halbwertsbreite von 0,5 ppm zur Referenz benutzt wurden. Die Linienform aus der Summe aller Aminosäuren sowie der wichtigsten Aminosäuren ist in Bild 7.34 mit der Messkurve dargestellt. Obwohl die beobachtete Intensität aufgrund der Kreuzpolarisation nicht mehr proportional zur Anzahl der Kohlenstoffatome ist, stimmen berechnete und gemessene Linienform qualitativ gut überein und erlauben eine partielle Zuordnung der Resonanzlinien. Dennoch werden im Folgenden die einzelnen aliphatischen Gruppen zusammengefasst und als Einheit betrachtet.

Einfluss des
Lösungsmittels

Bei Zugabe von Lösungsmittel ändert sich das ^{13}C -NMR-Spektrum für alle drei betrachtete Systeme in zwei Aspekten (Bild 7.35): Zum einen ist bei gleicher Kontaktzeit die Intensität der aliphatischen Kohlenstoffe im hydratisierten Protein geringer, was durch eine längere Transferzeit T_{CP} verursacht werden kann. Über eine

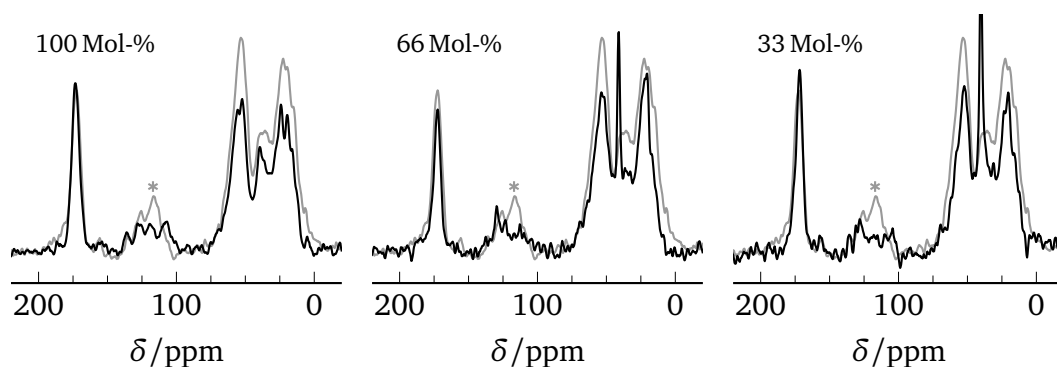


Bild 7.35: ^{13}C -NMR-Spektren von Lysozym in reinem Wasser (100 %) und Wasser-DMSO-Mischungen im Vergleich mit trockenem Lysozym (grau). Der Signalbeitrag des DMSO bei 40,5 ppm⁴⁹¹ ist nicht vollständig abgebildet.

solche Erhöhung mit dem Hydratationsanteil wurde bereits früher berichtet^{247,258,492} und als Zeichen erhöhter Dynamik gewertet. Zum anderen ist die Linienbrei-

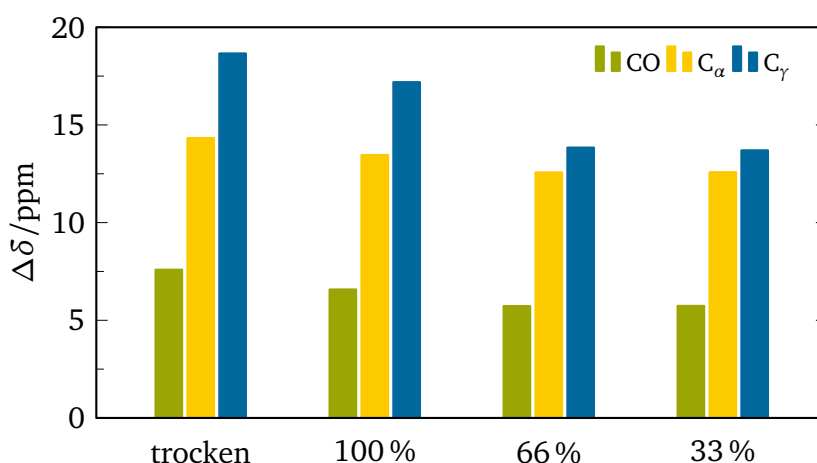


Bild 7.36: Linienbreite in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels.

te der einzelnen Signalgruppen verringert (Bild 7.36), jedoch ist nur für reines Wasser als Solvens eine Auflösung einzelner Resonanzen möglich. Die geringere Linienbreite wird möglicherweise dadurch verursacht, dass durch Fluktuationen des Proteins über die Verteilung isotroper chemischer Verschiebungen gemittelt wird.^{247,402} Im Fall der binären Lösungsmittel kann zudem eine Reduzierung der möglichen Konformationszustände vorliegen, wie sie in ^{13}C -NMR-Untersuchungen von DMPC-DMSO vorgeschlagen wird.⁴⁹³ Von DMSO ist bekannt, dass es an Peptiden eine Änderung der chemischen Verschiebung von 1 ppm bis 2 ppm im Vergleich zu reinem Wasser verursachen kann.⁴⁹⁴ Wären die Anteile des Lysozyms, die in Kontakt

mit DMSO sind, auf diese Weise beeinflusst, würde dies die Beobachtung der mangelnden Unterscheidbarkeit der Resonanzlinien erklären. Das Mischungsverhältnis des Wasser-DMSO-Lösungsmittels führt zu keinem erkennbar anderem Einfluss auf Spektrum des Lysozym. Sowohl die Linienbreite als auch die Intensität werden für beide untersuchten Systeme in gleichem Maße variiert.

Solvatation mit den binären Lösungsmitteln scheint das Protein in ähnlicher Weise wie die Zugabe von reinem Wasser zu beeinflussen. Zusätzlich treten vermutlich Effekte auf die lokale Umgebung, insbesondere um Seitenketten, auf. Die verwendeten Solvationsgrade reichen jedoch nicht aus, um eine Denaturierung des Proteins zu erreichen, wie sie für das 33 Mol-%-System beobachtet wurde.³⁴⁶

7.6 Zusammenfassung

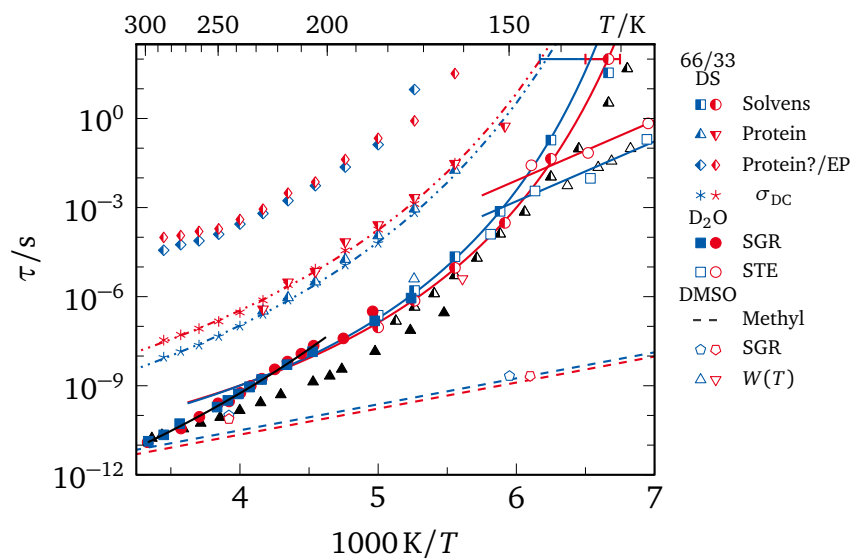


Bild 7.37: Überblick über die in dielektrischer Spektroskopie und ^2H -NMR charakterisierten Prozesse des 66 Mol-%- und des 33 Mol-%-Systems zusammen mit Korrelationszeiten des 66 Mol-%-Bulksystems.^{146,466}

Mit der Kombination aus dielektrischer Spektroskopie und verschiedenen ^2H -NMR-Methoden konnten mehrere Prozesse in Lysozym mit Wasser-DMSO-Mischungen als binärem Solvens auf ihre Temperaturabhängigkeit und auf den Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung hin untersucht werden (Bild 7.37).

Der langsamste Prozess, der in dielektrischer Spektroskopie beobachtet wurde, wird in der Literatur der Segmentbewegung des Proteins zugeordnet und mit dem Glasübergang dieser Systeme verbunden.^{25,155} Es konnte gezeigt werden, dass er für

die hier betrachteten Systeme jedoch höchstwahrscheinlich kein Relaxationsprozess ist, sondern als Elektrodenpolarisation ein experimentelles Artefakt dielektrischer Spektroskopie ist.

Ein zweiter Prozess wurde der Dynamik des Proteins, insbesondere der Seitenketten, zugeordnet. Die Gleichstromleitfähigkeit σ_{DC} ist eng mit diesem Prozess verknüpft. Zudem folgt dieser Prozess der Temperaturabhängigkeit der Lösungsmitteldynamik.

Der dritte und schnellste Prozess, der sowohl in dielektrischer Spektroskopie als auch in ^2H -NMR-Spektroskopie beobachtet wurde, ist der des Lösungsmittels. Im Temperaturbereich unter 200 K ist die Dynamik schwach vom Mischungsverhältnis abhängig. Für beide untersuchten Systeme zeigt sich eine dem 66 Mol-%-Bulksystem ähnliche Temperaturabhängigkeit. Während das Bulksystem allerdings die Charakteristika eines α -Prozesses besitzt, zeigen die Proteinsysteme Eigenschaften (z. B. eine temperaturabhängige Breite der Suszeptibilität), die man Sekundärprozessen zuordnet. In diesem Temperaturbereich folgen Lösungsmittel- und Proteindynamik einer gemeinsamen Temperaturabhängigkeit, wobei das Protein mehrere Größenordnungen langsamer als das Lösungsmittel ist. Diese Kopplung zwischen Solvens und Protein wurden auch in anderen Untersuchungen hydratisierter Proteine beobachtet.^{9,27,283,413} Bei Temperaturen unterhalb von 160 K unterscheiden sich die Korrelationszeiten, die aus den beiden experimentellen Methoden hervorgehen. Die Wasserdynamik, die mittels Stimulierten-Echo-Experimenten charakterisiert wurde, folgt einem Arrhenius-Gesetz, und ist schneller als die in dielektrischer Spektroskopie betrachtete Dynamik. Die Dynamik des Wassers stimmt mit jener eines universellen Wasserprozess überein, der für eine Vielzahl wasserhaltiger Systeme beobachtet wird.³⁸⁰ Am oberen Ende des betrachteten Temperaturbereichs verläuft die Wasserdynamik der Proteinsysteme nicht länger parallel zum Bulksystem und ist zudem nicht mehr mischungsabhängig. Die Änderung der Temperaturabhängigkeit fällt mit dem Einsetzen von Proteinfluktuationen zusammen, die anhand von Spin-Gitter-Relaxation beobachtet werden konnten.

Die Kopplung zwischen Protein und Lösungsmittel, wie sie die gemeinsame Temperaturabhängigkeit bei tiefen Temperaturen nahelegt, lässt sich mit den Vorstellungen des Slaving-Modells vereinbaren.⁴⁵ Dieses Modell ist allerdings nicht in der Lage, die Veränderungen in der Wasserdynamik zu erklären, da es keine gegenseitige Beeinflussung zwischen Protein und Lösungsmittel vorsieht. Hier wäre die Modellvorstellung, die das Lösungsmittel als Weichmacher des Proteins interpretiert und die über eine veränderliche Energielandschaft auch eine Beeinflussung des Lösungsmittels ermöglicht,²³ ein besserer Erklärungsansatz. Im Rahmen des Coupling-Modells, das zur Beschreibung von Proteinsystemen herangezogen wird,^{24,25} ist eine Erklärung aller Beobachtungen nicht möglich. Auch wenn man den Lösungsmittelprozess als

β -Prozess des Protein-Solvens-System auffasst, wird eine Änderung der Temperaturabhängigkeit während des Glasübergangs des Systems erwartet. Die Änderung bei 200 K tritt allerdings weder beim kalorimetrischen Glasübergang auf noch wird ein dynamischer Prozess auf der Zeitskala von 100 s beobachtet. Keiner der typischen Erklärungsansätze zur Dynamik in Proteinsystemen kann die hier untersuchten Systeme vollständig beschreiben.

8 VERGLEICH DER SYSTEME UND DISKUSSION

In den vorherigen Kapiteln wurde die Dynamik der verschiedenen Protein-Lösungsmittel-Systeme, die untersucht wurden, hauptsächlich getrennt voneinander betrachtet. Daher werden im Folgenden systemübergreifende Befunde zusammengetragen, um ein umfassenderes Bild über die Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel zu erhalten. Die vorhandenen Ergebnisse werden zudem den in Abschnitt 2.3 genannten Modellen zur Beschreibung der Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung gegenüber gestellt.

8.1 Proteindynamik

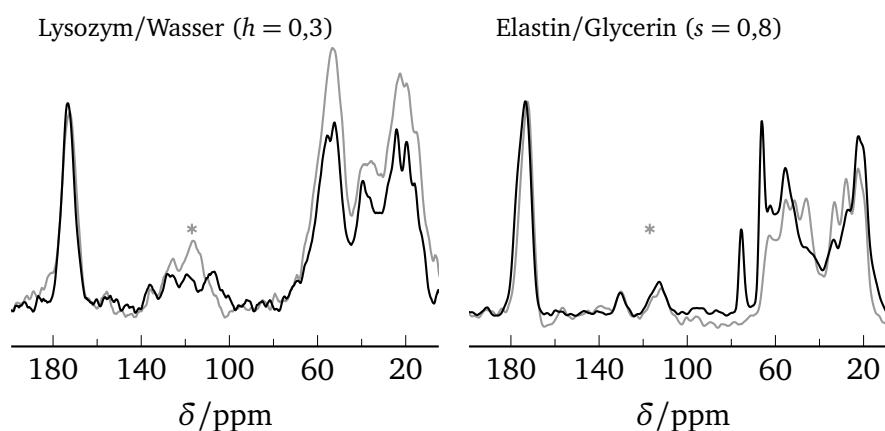


Bild 8.1: Unterschiede im ^{13}C -NMR-Spektrum von Lysozym (Abschnitt 7.5) und Elastin (Abschnitt 6.1). Spektren der trockenen Proteine sind in grau, Spektren der Protein-Lösungsmittel-Systeme in schwarz dargestellt.

Die Proteindynamik wurde im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich anhand von ^{13}C -NMR-Spektren diskutiert. Die Effekte durch Zugabe von Lösungsmittel unterscheiden sich bei beiden untersuchten Proteinen Lysozym und Elastin. Lysozym zeigt eine verbesserte Auflösung von Resonanzen, qualitativ ähnelt es jedoch dem trockenen System (Bild 8.1a). Dieses Verhalten wurde bereits in früheren Untersuchungen für Lysozym und andere Proteine bei Hydratation beobachtet.^{125,247,402,495,496} Elastin ähnelt dem Lysozym in dieser Hinsicht nur bei einem Glycerin-Solvationsgrad von $s = 0,3$, bei vollständiger Solvation zeigt es hingegen einen deutlichen Verlust in der Auflösung (Bild 8.1b). Diese Effekte werden ebenfalls für Glutenin-Untereinheiten gefunden, das wie Elastin viskoelastisch bei Hydratation wird.⁴⁹⁷ Eine Eigenschaft, mit deren Hilfe sich der Unterschied zwischen den Proteinen erklären lässt, ist das Fehlen einer Sekundärstruktur im Elastin. ^{13}C -NMR-Untersuchungen

haben gezeigt, dass strukturierte Anteile des Proteins höhere Ordnungsparameter⁴⁹⁸ und weniger Dynamik als ungeordnete Bereiche aufweisen.⁴⁹⁹ Ein Vergleich von Polylysin und Lysozyme ist zudem zu dem Ergebnis gekommen, dass eine geringere Sekundärstruktur eine größere Mobilität des Proteinerückgrats ermöglicht.¹⁵⁷ Der Vergleich der Proteine legt somit nahe, dass kleinamplitudige Bewegungen, die über Konformationszustände mitteln, unabhängig von der Art des Proteins durch Solvation ermöglicht werden. Proteine ohne ausgeprägte Sekundärstruktur wie Elastin werden darüber hinaus deutlich beweglicher und großamplitudige Fluktuationen sind beobachtbar.

Sowohl in den Lysozym-Systemen, die mit dielektrischer Spektroskopie betrachtet wurden, als auch in der Untersuchung des Elastin-Wasser-Systems mit quasi-elastischer Neutronenstreuung wurde beobachtet, dass Proteindynamik, die auf kleinamplitudige Fluktuationen des Proteins zurückgeführt werden kann, der Temperaturabhängigkeit der Lösungsmitteldynamik folgt. Die absolute Zeitskala ist jedoch drei Größenordnungen größer als die des Lösungsmittels (Bild 8.2b,c). Ähnliche Zusammenhänge zwischen Protein und Lösungsmittel wurden auch in anderen Untersuchungen beobachtet.^{9,27,283,413} Die hier gemachten Beobachtungen weisen auf einen starken Einfluss des Lösungsmittels auf diesen dynamischen Prozess hin.

8.2 Lösungsmitteldynamik

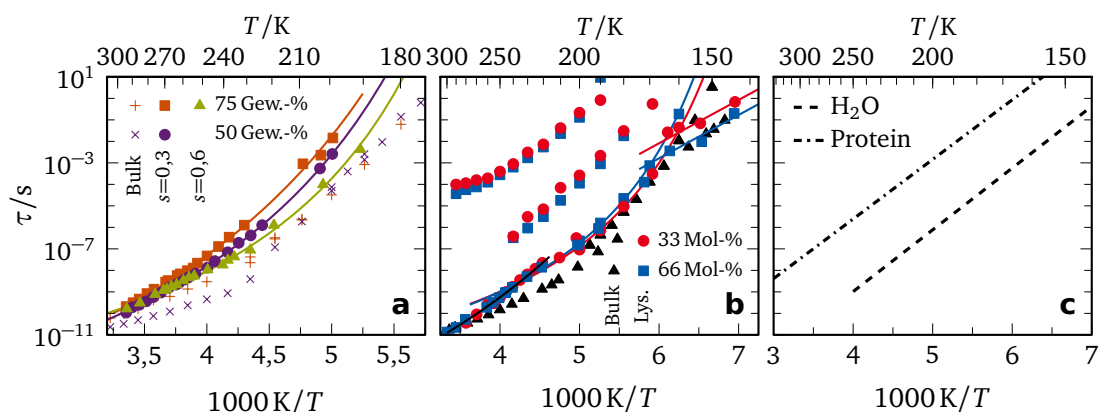


Bild 8.2: (a) Glycerindynamik in Elastin-Wasser-Glycerin-Systemen aus Kapitel 6.3; (b) Wasserdynamik und Proteindynamik in Lysozym-Wasser-DMSO-Systemen aus Kapitel 7 (Details in Bild 7.37); (c) Temperaturabhängigkeit der Wasser- und Proteindynamik in hydratisiertem Elastin aus Kapitel 5.

Die Lösungsmitteldynamik wurde mit allen drei verwendeten Untersuchungsmethoden betrachtet. Die Wasserdynamik in hydratisiertem Elastin und in den Lysozym-

Systemen für Temperaturen $T < 160\text{ K}$ folgt einem Arrhenius-Verlauf mit einer Aktivierungsenergie von $E \approx 0,55\text{ eV}$. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Befunden, die für andere wasserhaltige Systeme gemacht wurden.³⁸⁰

In den binären Lösungsmittelsystemen Wasser-Glycerin und Wasser-DMSO folgt die Dynamik bei ausreichend hohem Solvatationsgrad der Dynamik der entsprechenden Bulksysteme. Ein deutlicher Einfluss des Proteins auf die Lösungsmitteldynamik ist in diesen Systemen anhand einer verringerten Abhängigkeit der Dynamik von der Zusammensetzung des Lösungsmittels zu beobachten. Die unterliegende Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ ist symmetrisch und weist für die Mischungssysteme wie auch für die Wasserdynamik keine temperaturunabhängige Verteilungsbreite auf, sondern verbreitert sich mit sinkender Temperatur. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Untersuchungen gemacht^{16,147,291} und weist darauf hin, dass die Lösungsmitteldynamik allgemein in Protein-Lösungsmittel-Systemen die Rolle eines Sekundärprozesses einnimmt.

8.3 Dynamischer Übergang

Aus den Ergebnissen sowohl der quasielastischen Neutronenstreuung als auch der ^2H -NMR folgt, dass die Temperatur $T \approx 200\text{ K}$ für die Proteindynamik hydratisierter Systeme eine besondere Rolle spielt. Dort wird eine Änderung der Temperaturabhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats der quasielastischen Neutronenstreuung und der ^2H -Spin-Gitter-Relaxationszeit der Proteinkomponente beobachtet. Ein Vergleich mit Untersuchungen an anderen Proteinsystemen zeigt, dass eine Änderung des Verhaltens bei dieser Temperatur unabhängig von der Wahl des Proteins auftritt.^{16,145,178,200,274,321} Die Gemeinsamkeit dieser Systeme ist die Existenz einer Hydrathülle. Zusammen mit der Beobachtung, dass in trockenen Proteinsystemen keine Änderung der Temperaturabhängigkeit zu sehen ist, legt dies nahe, dass es sich hierbei um dynamische Prozesse handelt, die durch die Anwesenheit des Wassers ermöglicht werden.

Die Änderung des mittleren Verschiebungsquadrats liegt für die betrachteten Systeme unabhängig von der vorhandenen experimentellen Zeitskala bei dieser Temperatur. Dies legt nahe, dass der für den Übergang verantwortliche Prozess einen Glasübergang durchführt. Für hydratisiertes Lysozym und Myoglobin wird in diesem Temperaturbereich in kalorimetrischen Untersuchungen Anzeichen eines Glasübergangs gefunden.^{28,120} Im Gegensatz dazu ist die Glasübergangstemperatur hydratisierten Elastins bei $T_g > 300\text{ K}$ und kann zur Erklärung des Übergangs nicht herangezogen werden. Zudem legen die Ergebnisse aus ^2H -NMR-Spektroskopie nahe, dass es sich nicht um einen α -Prozess des Proteins handelt: Die Proteinkomponente weist im Gegensatz zu den Erwartungen für glasbildende Systeme⁵³ sowohl in

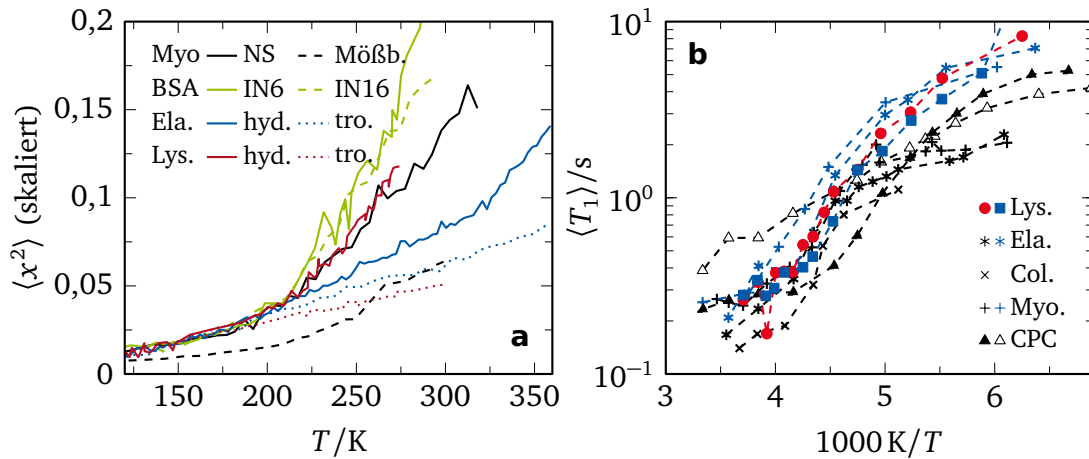


Bild 8.3: Dynamische Übergänge bei 200 K im mittleren Verschiebungsquadrat (a) und in Spin-Gitter-Relaxation (b) für verschiedene Protein-Lösungsmittel-Systeme. Details zu den Systemen in Bild 5.11 bzw. Bild 7.24.

den hier betrachteten Systemen als auch in Systemen, die der Literatur entnommen wurden,^{16,200} einen nichtexponentiellen Magnetisierungsaufbau auf. Zusätzlich wird auch noch bei Temperaturen $T \gg 200$ K ein Pakespektrum für die Linienform des Proteins beobachtet,¹⁴⁵ was auf ein Fehlen einer isotropen Reorientierung des Proteins hinweist. Molekuldynamik-Simulationen und NMR-Untersuchungen zeigen ein Ansteigen der Bewegungsamplitude lokaler Fluktuationen.^{125,145,157} Eine schwache Abhängigkeit des T_1 -Übergangs von Protein und vom Lösungsmittel deuten darauf hin, dass Faktoren wie beispielsweise Primär- und Sekundärstruktur möglicherweise eine in der Zukunft genauer zu untersuchende Rolle spielen.

Von Ngai et al. wird anhand von Beobachtungen an trockenen Proteinen ebenfalls ein Übergang bei $T \approx 200$ K postuliert,¹⁷⁴ der auf einen Glasübergang eines JG- β -Prozesses zurückgeführt wird. Die Befunde dieser Arbeit legen aber nahe, dass dieser Übergang nicht nur im trockenen Protein, sondern auch im hydratisierten Zustand bei dieser Temperatur auftritt. Sollten beide Übergänge auf den gleichen Prozess zurückgehen, würde die Anwesenheit einer Hydrathülle nicht primär zu einer Änderung der Zeitskala führen, sondern durch eine Vergrößerung der Bewegungsamplitude die Proteindynamik anstoßen.

Da in den betrachteten Systemen Wasser als Lösungsmittel eine Gemeinsamkeit ist, kann auch ein möglicher Glasübergang des Wassers bei $T \approx 190$ K, für den in manchen Untersuchungen Anzeichen gefunden werden,^{240,388,389} als weitere Ursache in Betracht gezogen werden. Allerdings wird in der Spin-Gitter-Relaxation auch für Wasser-DMSO-Systeme ein Übergang in diesem Temperaturbereich beobachtet, für die eine Glasübergangstemperatur bereits bei 150 K gefunden wird. Es scheint

daher unwahrscheinlich, dass ein Glasübergang des Lösungsmittels ursächlich für diese Übergänge ist.

8.4 Modelle zur Wechselwirkung zwischen Proteinen und Lösungsmittel

In Abschnitt 2.3 wurden verschiedene Modelle vorgestellt, die den Anspruch erheben, die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Lösungsmitteln zu beschreiben. Die Erkenntnisse, die bisher anhand der Beobachtungen in dieser Arbeit gemacht wurden, sollen nun mit diesen Modellen verglichen werden.

Im Slaving-Modell¹⁰⁶ von Frauenfelder et al. wird der dynamische Übergang des mittleren Verschiebungsquadrats auf ein Kreuzen des von ihnen β_h genannten Prozesses und des experimentellen Zeitfensters zurückgeführt. Wie aber die Auswertung in Kapitel 5 und auch der Vergleich mit den Ergebnissen zu anderen Protein-Wasser-Systemen (Bild 8.3) zeigt, ist der Übergang bei $T = 200$ K auflösungsunabhängig, was dieser Annahme widerspricht. Auch den beobachteten Übergang des mittleren Verschiebungsquadrats bei der Glasübergangstemperatur des Elastin-Wasser-Systems sollte es bei diesen Hydratationsgraden nicht geben, da großamplitudige Fluktuationen des Proteins im Slaving-Modell die Anwesenheit von Bulklösungsmittel voraussetzen.¹⁸ In der Untersuchung der Hydrationsabhängigkeit der Dynamik von Polymeren wurde jedoch eine Kopplung solcher Fluktuationen an die Wasserdynamik bereits für Gewichtsanteile von 15 Gew.-% bis 20 Gew.-% festgestellt.³⁸¹ Somit ist es denkbar, dass der hier verwendete Hydratationsgrad ausreicht, um „ α “-ähnliche Fluktuationen zu ermöglichen.

Slaving-
Modell

Im Rahmen des Slaving-Modells wird der Einfluss des Proteins auf das Lösungsmittel nicht diskutiert, sondern lediglich von lösungsmittel-versklavter oder lösungsmittel-gekoppelter Proteindynamik gesprochen. Im Gegensatz dazu werden in dieser Arbeit durchaus Effekte des Proteins auf das Verhalten des Lösungsmittel beobachtet. Die Aussage „The β_h fluctuations of the hydration shell are different than the β fluctuations of the bulk solvent.“³⁸² deutet implizit darauf hin, dass dieses Modell nicht grundsätzlich einen wechselseitigen Einfluss zwischen beiden Komponenten ausschließt. Insgesamt fehlt daher in diesem Erklärungsansatz eine genauere Beschreibung der Effekte des Proteins auf das Lösungsmittel, was bereits in anderen Untersuchungen festgehalten wurde.^{154,164,186}

Von Doster, der das Lösungsmittel als Weichmacher durch ein gemeinsames Wasserstoffbrückennetzwerk ansieht, werden für hydratisierte Proteine zwei Übergänge im mittleren Verschiebungsquadrat erwartet, die beide durch die Lösungsmitteldynamik bestimmt werden. Ein Übergang wird z. B. für Myoglobin bei 200 K auf einen Glasübergang des Lösungsmittels zurückgeführt.¹⁹⁰ Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Lösungsmitteldynamik an der Proteinoberfläche Kennzeichen eines

Lösungsmittel als
Weichmacher

Sekundärprozesses aufweist. Dies steht im Widerspruch mit der Annahme, dass die Lösungsmitteldynamik auch am Protein noch als α -Prozess aufgefasst werden kann. Ein zweiter dynamischer Übergang, wenn der α -Prozess des Wassers auf der experimentellen Zeitskala ist, wird im Elastin-Wasser-System nicht gefunden.

Coupling-Modell Im Rahmen des Coupling-Modells von Ngai et al. werden für hydratisierte Proteine mehrere Übergänge im mittleren Verschiebungsquadrat erwartet. So wird ein Übergang bei der Glasübergangstemperatur des Protein- α -Prozesses und einer damit einhergehenden Änderung der Amplitude eines Nearly Constant Loss in Verbindung erwartet.²⁵ Dieser Übergang wird auch für das hydratisierte Elastin bei 320 K gefunden. Allerdings wird die gefundene Übereinstimmung mit dem Modell dadurch in Frage gestellt, dass die Erwartungen des Coupling-Modells auf dem ebenfalls im hydratisierten Elastin gefundenen Übergang bei 200 K basieren. Zwar findet ab diesem Übergang eine Vergrößerung der Bewegungsamplitude von Proteinfluktuationen statt, was mit der postulierten Änderung des Nearly Constant Loss in Einklang gebracht werden kann. Die Zurückführung auf einen α -Prozess ist aber sowohl wegen der Glasübergangstemperatur des Elastins als auch wegen der Befunde der NMR-Experimente, die gegen einen α -Prozess sprechen, nicht möglich. Ein zweiter dynamischer Übergang des mittleren Verschiebungsquadrats wird ähnlich wie im Slaving-Modell dann erwartet, sobald der Wasserprozess das experimentellen Zeitfenster kreuzt. Dieser Übergang, der bei etwa 240 K auftreten würde, lässt sich für Elastin jedoch nicht beobachten. Für reine Protein-Wasser-Systeme wird die Wasserdynamik als JG- β -Prozess des Bulkwassers interpretiert.²⁴ Die Beobachtungen für reines Wasser und Wassermischungen sind abgesehen von der Temperaturabhängigkeit sehr ähnlich und die Dynamik der Mischungen stimmt mit der Temperaturabhängigkeit des α -Prozesses der Bulksysteme überein. Daher ist die Interpretation des Lösungsmittelprozesses als JG- β -Prozess des Bulksystems zumindest nicht verallgemeinerbar, was Wasser als spezielles Solvens darstellen würde.

Flüssig-Flüssig-Phasenübergang Ein Flüssig-Flüssig-Phasenübergang wird für Wasser bei $T = 225$ K postuliert¹⁹⁵ und soll zu einer veränderten Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeit und des mittleren Verschiebungsquadrats zu führen.^{194,196} Wie in anderen Untersuchungen zuvor^{16,23,154,200,201} zeigen die Ergebnisse aus quasielastischer Neutronenstreuung stattdessen eine kontinuierliche Entwicklung dieser Größen bei dieser Temperatur.

Zum Abschluss lässt sich demnach festhalten, dass die unterschiedlichen Modelle (Slaving-, Weichmacher- und Coupling-Modell) einzelne Aspekte der Protein-Lösungsmittel-Dynamik beschreiben können. Für alle Erklärungsansätze finden sich jedoch Beobachtungen, die von diesen nicht abgedeckt werden oder diesen widersprechen.

9 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Dynamik in verschiedenen Protein-Lösungsmittel-Systemen mit einer Kombination aus experimentellen Methoden untersucht. Im Einzelnen wurde quasielastische Neutronenstreuung, dielektrische Spektroskopie und NMR-Spektroskopie verwendet, um die Möglichkeit zu erhalten, sowohl einen großen dynamischen Bereich als auch einzelne Komponenten betrachten zu können. Untersucht wurden die Systeme Elastin mit Wasser, Wasser-Glycerin-Mischungen und Glycerin als Lösungsmittel sowie Lysozym mit Wasser-DMSO-Mischungen.

Für Elastin-Glycerin-Systeme konnte anhand von Änderungen der Linienform von ^{13}C -NMR-Spektren bei Änderung des Solvatationsgrads Anzeichen sowohl von kleinamplitudigen als auch großamplitudigen Fluktuationen des Proteinrückgrats gefunden werden. Diese treten bei Raumtemperatur für Solvatationsgrade $s > 0,2$ bzw. $s > 0,6$ auf. Die Abhängigkeit vom Solvatationsgrad ähnelt dem Bild für hydratisiertes Myoglobin von Frauenfelder et al., die kleinamplitudige Fluktuationen auf eine gekoppelte Bewegung von Lösungsmittel und der Proteinoberfläche zurückführen, während großamplitudige Fluktuationen höhere Solvatationsgrade benötigen.^{18,45} Dies legt nahe, dass diese Verbindung zwischen den beiden Komponenten weder von der Art des Proteins abhängt noch spezifisch für Wasser als Solvens ist. ^{13}C -NMR-Spektren von Elastin in Wasser-Glycerin-Mischungen zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Proteindynamik von der Zusammensetzung des Lösungsmittels. Ein steigender Glycerinanteil und daraus folgende steigende Viskosität führte zu einer Verringerung der Elastinmobilität. Aus der Temperaturabhängigkeit der Spektren konnte zudem geschlossen werden, dass Elastindynamik unterhalb einer Temperatur von 245 K unabhängig vom Mischungsverhältnis langsamer als $\tau \approx 10^{-5}$ s ist.

Während die Proteindynamik eine deutliche Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung aufweist, reduziert das Protein diese Abhängigkeit für die Lösungsmitteldynamik. In der ^2H -NMR-Untersuchung der Glycerindynamik in Wasser-Glycerin-Mischungen an Elastin wurde jedoch eine starke Abhängigkeit vom Solvatationsgrad festgestellt. Bei einem Solvatationsgrad von $s = 0,3$, für den nur kleinamplitudige Proteindynamik beobachtet wird, ist die Glycerindynamik im Vergleich zum Bulksystem stark verlangsamt und zeigt eine weniger fragile Temperaturabhängigkeit. Bei Erhöhung des Solvatationsgrads auf $s = 0,6$, für den großamplitudige Proteinfluktuationen beobachtet werden, sind die Korrelationszeiten von Glycerin den Werten des Bulksystems ähnlich.

Auch für die Wasserdynamik der Lysozymsysteme wurde eine im Vergleich zu Bulk reduzierte Abhängigkeit von der Mischungszusammensetzung gefunden. Der Sol-

hydratationsgrad hier war so gewählt, dass die Proteindynamik voll ausgebildet war. Unterhalb von 200 K folgten auch hier die Korrelationszeiten des Lösungsmittels der Temperaturabhängigkeit des Wasser-DMSO-Bulksystems. Oberhalb dieser Temperatur wird eine im Vergleich zur Bulkodynamik stärkere Temperaturabhängigkeit beobachtet. Als Grund für diese Änderung kommt das Einsetzen erhöhter Proteinbeweglichkeit in Frage, auf die im Folgenden noch genauer eingegangen wird.

Die Wasserdynamik in hydratisiertem Elastin wurde mit quasielastischer Neutronenstreuung charakterisiert. Diese Methode erlaubte es zu zeigen, dass Dynamik des Hydratwassers als diffusive Dynamik mit einer Verteilung von Aktivierungsenergien beschrieben werden kann. Die gefundene Energieverteilung mit $E_m \approx 0,55$ eV ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen der Wasserdynamik, die ebenfalls diesen universellen Wasserprozess an Grenz- und Oberflächen beobachten.³¹⁷

Auch in den anderen Systemen werden symmetrische Verteilungen von Korrelationszeiten gefunden, deren Verteilungsbreiten mit sinkender Temperatur zunehmen. Die im Vergleich zu Bulksystemen zusätzlichen Beiträge zur Verteilung können auf die Verlangsamung von Lösungsmittelmolekülen in engem Kontakt mit der Proteinoberfläche zurückgeführt werden, wie Molekulardynamiksimulationen nahelegen.¹²⁶ Die temperaturabhängige Breite der Verteilungen deutet darauf hin, dass der Lösungsmittelprozess die Rolle eines Sekundärprozesses im Protein-Solvens-System einnimmt.

Sowohl in hydratisiertem Elastin mittels quasielastischer Neutronenstreuung als auch in Lysozym in Wasser-DMSO mittels dielektrischer Spektroskopie konnte die Temperaturabhängigkeit eines Proteinprozesses verfolgt werden. Eine genauere Aussage über die mikroskopische Ursache des Prozesses ist anhand der Daten leider nicht möglich. Er ist an die Dynamik des Lösungsmittelprozesses gekoppelt, da die beobachtete Proteindynamik zwar mehrere Größenordnungen langsamer als die Lösungsmitteldynamik ist, aber deren Temperaturabhängigkeit folgt.

In der Untersuchung mittels dielektrischer Spektroskopie an Lysozym in Wasser-DMSO wurde noch ein dritter Prozess beobachtet. In der Literatur wird er teilweise mit Segmentrelaxation und dem Glasübergang des Proteins in Verbindung gebracht.^{109,155} In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine alternative Interpretation als Elektrodenpolarisation und damit als experimentelles Artefakt der dielektrischen Spektroskopie möglich ist.

Das mittlere Verschiebungsquadrat, das aus quasielastischer Neutronenstreuung gewonnen wurde, zeigt hydrationsunabhängig eine Änderung der Temperaturabhängigkeit bei $T \approx 140$ K, die der Methylgruppenrotation zugeordnet werden kann. Eine Änderung des mittleren Verschiebungsquadrat bei $T = 240$ K aufgrund

von Zeitskaleneffekten, die in verschiedenen Modellen zur Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung erwartet wird, konnte hingegen nicht beobachtet werden. In hydratisiertem Elastin konnten zwei zusätzliche Übergänge beobachtet werden: Der Übergang bei $T = 320\text{ K}$ kann auf den Glasübergang des Elastinsystems zurückgeführt werden.

Der zweite Übergang tritt bei $T \approx 200\text{ K}$ auf. Ein Vergleich mit den Befunden zu anderen hydratisierten Proteinsystemen führt zu zwei Beobachtungen: Zum einen ist der Übergang proteinunabhängig, zum anderen tritt er unabhängig von der zeitlichen Auflösung des Experiments bei dieser Temperatur auf, was auf eine dem Glasübergang ähnliche Ursache hinweist. Ein Übergang in diesem Temperaturbereich wurde ebenfalls für die Proteindynamik des Lysozymsystems dieser Arbeit und für hydratisierte Proteine der Literatur mithilfe von ^2H -NMR-Methoden beobachtet. Mithilfe der Ergebnisse aus der NMR-Spektroskopie konnten die Natur des Übergangs und der Einfluss des Lösungsmittels näher beleuchtet werden: Die unterliegende Proteindynamik des Übergangs ist entgegen der Interpretation in der Literatur²⁵ nicht mit dem α -Prozess des Proteins verknüpft, sondern mit anisotroper Kleinwinkelbewegung des Proteins. Durch Hydratation des Proteins erhöht sich die Amplitude dieser Bewegung, was die Beobachtung des Übergangs ermöglicht. Die bereits erwähnte Änderung der Temperaturabhängigkeit der Wasserdynamik an Lysozym, die ebenfalls in diesem Temperaturbereich auftritt, ist ein Kennzeichen, dass eine wechselseitige Beeinflussung zwischen Proteinfluktuationen und Lösungsmitteldynamik herrscht.

Zuletzt wurden verschiedene Modelle zur Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung genauer bezüglich ihrer Fähigkeit diskutiert, die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen beschreiben zu können. Keines der betrachteten Modelle ist vollständig in der Lage, alle Beobachtungen erklären zu können. Im Rahmen des Slaving-Modells lassen sich die gemeinsame Temperaturabhängigkeit von Protein- und Lösungsmitteldynamik beschreiben und die Abhängigkeit von Proteinfluktuationen vom Solvatationsgrad verstehen. Es fehlt aber eine qualitative und quantitative Beschreibung des Einflusses, den das Protein auf das Lösungsmittel ausübt. Das Coupling-Modell lässt sich mit den Beobachtungen zum dynamischen Übergang in Einklang bringen, allerdings sind die Annahmen zur Lösungsmitteldynamik nicht von reinem Wasser auf andere Lösungsmittel zu übertragen.

Diese Arbeit zeigt, wie komplex die Prozesse und Wechselwirkungen in Protein-Lösungsmittel-Systemen sind und wie unvollständig unser Verständnis darüber ist. Sie zeigt auch die Notwendigkeit, eine Kombination sich ergänzender Methoden anzuwenden, um die immer noch offenen Fragestellungen in der Zukunft beantworten zu können.

A. AUSWERTEPROGRAMM^{*}

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Softwareprogramm zur Auswertung von NMR-Messdaten geschrieben, da existierende Programme wie beispielsweise Origin nur unzureichend die Bearbeitung von Rohdaten ermöglichen oder wie Matlab Vorkenntnisse zum Schreiben von Skripten benötigen. Der Funktionsumfang des Programms ist daher auf die Erfordernisse von NMR-Experimente zugeschnitten, kann aber auch zur Datenanalyse beliebiger anderer Messdaten benutzt werden. Beispiele dafür sind die Daten aus quasielastischer Neutronenstreuung und dielektrischer Spektroskopie in dieser Arbeit. Zusätzlich ist das Programm durch seine grafische Oberfläche so angelegt, dass auch Benutzer ohne Vorkenntnisse direkt eine Auswertung von Messdaten vornehmen können. Außerdem sollen zusätzliche Fitmodelle möglichst einfach implementiert werden können, um hier eine große Flexibilität beizubehalten. Geschrieben in Python (Version 2.7[†]), basiert die eigentliche Datenverarbeitung auf den Python-Bibliotheken Scipy⁵⁰⁰ und Numpy,⁵⁰¹ die grafische Oberfläche ist auf Basis von PyQt4⁵⁰² und pyqtgraph⁵⁰³ geschrieben. Obwohl das Programm eine grafische Oberfläche besitzt, sind sämtliche Funktionen des Programms, die zur Datenauswertung gedacht sind, so konzipiert, dass sie auch unabhängig davon in Python-Skripten benutzt werden können.

A.1 Anwendungsbeschreibung

Das Programm ist in zwei eigenständige Komponenten aufgeteilt: Die erste Komponente wird dazu verwendet, Zeitsignale und Spektren zu bearbeiten und daraus Abhängigkeiten (z. B. T_1 -Aufbaukurven) zu extrahieren, die in der zweiten Komponente weiter bearbeitet und ausgewertet werden können. Gemeinsamkeiten beider Programmteile bestehen im Lesen und Schreiben von Daten, in der Anpassung von Modellfunktionen an Datensätze und in der allgemeinen Bearbeitung der Datenwerte. Mit wenigen Ausnahmen können alle implementierten Operationen auf mehrere Datensätzen gleichzeitig angewendet werden.

Gelesen werden können neben Textdateien sowohl die vom Messprogramm DAMARIS³⁵⁸ erzeugten HDF-Dateien als auch die vom Programm NTNMR erzeugten Binärdateien mit Messresultaten. Datensätze wie auch Fitkurven und Fitparameter können sowohl im HDF-Format als auch als Textdateien gespeichert werden, Graphen können neben gängigen Bildformaten (JPEG, PNG, ...) auch im agr-Format des Programms Grace exportiert werden. Außerdem können laufende Sitzungen im

^{*} Kreativität bei der Namenswahl wurde nicht beim Erstellen des Programms erwartet.

[†] Teile der Bibliothek sind auch unter Python 3 lauffähig, eine vollständige Unterstützung ist aber bisher noch nicht erreicht.

Binärformat zwischengespeichert werden, so dass zu einem späteren Zeitpunkt an diesen weitergearbeitet werden kann.

Anwendung von mathematischen Operationen auf die Datensätze ist ebenfalls möglich mit allen in Numpy verfügbaren Funktionen und allen bisher erzeugten Variablen (z. B. Addition von Datensätzen, Normierung auf Fitparameter, Logarithmieren von Werten, ...). Weitere Funktionen, die im Programm verfügbar sind, sind Methoden zur Glättung von Daten, zur Interpolation und zur numerischen Ableitung, genauso wie zu Fouriertransformation von Daten mit logarithmisch verteilten x-Werten.

Zusätzlich besitzen beide Programmteile weitere Optionen, die die allgemeine Funktionalität erweitern. So besitzt der Teil zur Bearbeitung von Zeitsignalen die Möglichkeit der Baseline- und Phasenkorrektur nullter und erster Ordnung, des Entferns von Punkten durch Linksverschiebung, und der Anwendung von Fensterfunktionen. Die Liste der Fensterfunktionen umfasst dabei sehr allgemeine wie eine Stufenfunktion oder eine Exponentialfunktion, aber auch NMR-spezifische wie die Traficante-Funktion.⁵⁰⁴ Diese Einstellungen können interaktiv eingestellt werden, sodass Auswirkungen der Parameterwahl direkt ersichtlich sind.

Bearbeitung von
Spektren

Auch die Integration über einzelne Linien von Spektren ist eingebaut, die neben Absolutwerten auch relative Intensitäten anzeigt und speichert (Bild A.1).

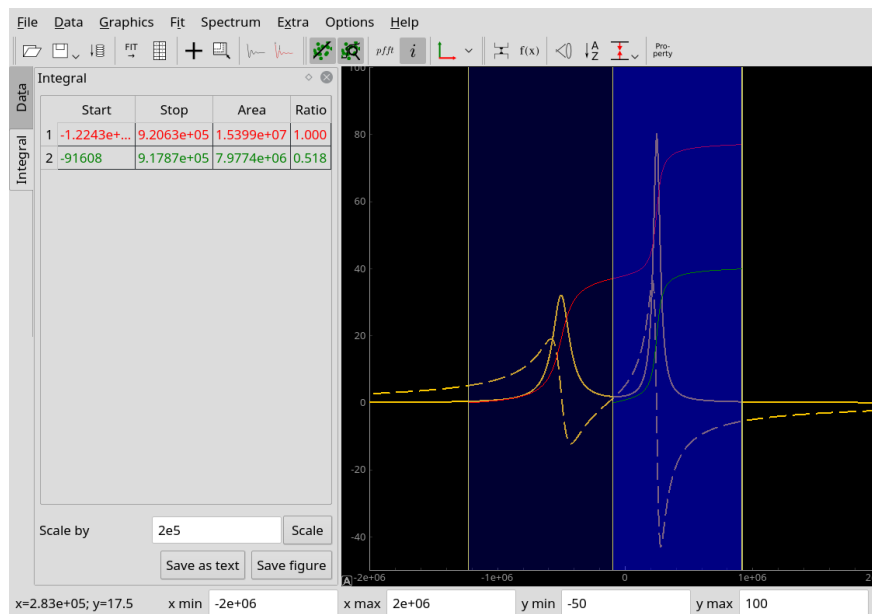


Bild A.1: Integration über zwei Lorentzlinien.

Um aus Zeitsignalen oder Spektren z. B. Magnetisierungskurven zu erhalten, besteht die Möglichkeit, einzelne Punkte oder Bereiche auszuwählen (Bild A.2).

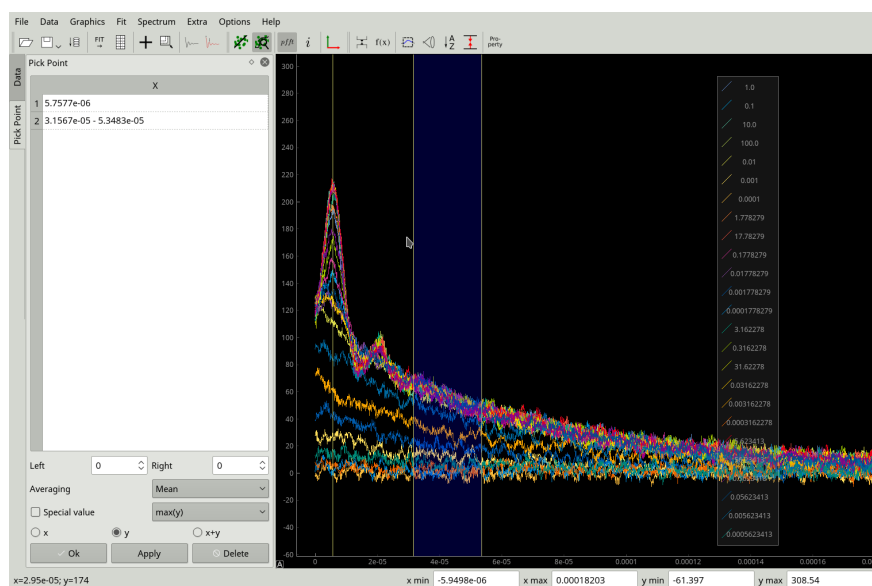


Bild A.2: Auswahl von Punkten im Auswerteprogramm

A.2 Auswertung von Zeitsignalen

Im Programmteil zur Auswertung von Zeit- und Temperaturabhängigkeiten finden sich diverse Funktionen, die im Rahmen der Auswertung von T_1 -Daten benötigt werden. Aufgrund des Umfangs der Rohdaten, die während einer Field-Cycling-Messung entstehen, kann die Frequenz- und Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit auch direkt aus den HDF-Dateien gewonnen werden ohne Zeitsignale manuell auswerten zu müssen. Zusätzlich ist die Berechnung von T_1 -Zeiten für beliebige Spektraldichten zu gegebenen Korrelationszeiten oder für bekannte Temperaturabhängigkeiten möglich. Auch der umgekehrte Weg, anhand des T_1 -Minimums die Form der spektralen Dichte festzulegen und damit Korrelationszeiten zu gewinnen, ist implementiert. Dafür kann das Minimum durch Messdaten, aber auch durch Interpolation einer Parabel festgelegt werden. Allerdings ist dieser Programmteil nicht ausschließlich zur Auswertung der Spin-Gitter-Relaxation, sondern ist im Gegensatz zur Programmkomponente zur Auswertung von Zeitsignalen weniger auf die Anforderungen der NMR-Methoden fixiert. Die Bearbeitung von Daten in diesem Teil ist grundsätzlich mit jedem beliebigen Datensatz möglich.

A.3 Fitfunktionen

Die Anpassung von Funktionen an die Daten ist in Bild A.3 für Diffusionsmessungen gezeigt. Für jeden Datensatz kann dafür ein unabhängiger Satz an Fitparametern, aber auch an globalen Parametern (wie im Beispiel der Diffusionskoeffizient D)

variiert werden. Die Auswahl der Fitfunktion erfolgt über Drop-down-Menüs, wobei mehrere Funktionen nacheinander durch die entsprechende Option addiert bzw. multipliziert werden können. Dadurch lassen sich beispielsweise mehrstufige Prozesse auch ohne vordefinierte Funktion anpassen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Punkt-vor-Strichregelung nicht beachtet wird, sondern die Funktionen in der Reihenfolge abgearbeitet werden, in der sie hinzugefügt werden. Abhängig von der Funktion können drei Typen von Parametern auftreten: Freie Parameter, die angepasst werden können (im Bild M_0 , D , $T_{\text{Rel.}}$, $\beta_{\text{Rel.}}$), Parameter mit festen Werten (g , t_p/t_m) und Optionen, die per Drop-down-Menü ausgewählt werden können (γ , *Varied time*). Natürlich können freie Parameter ebenfalls festgehalten werden und mit oberen und unteren Schranken versehen werden.

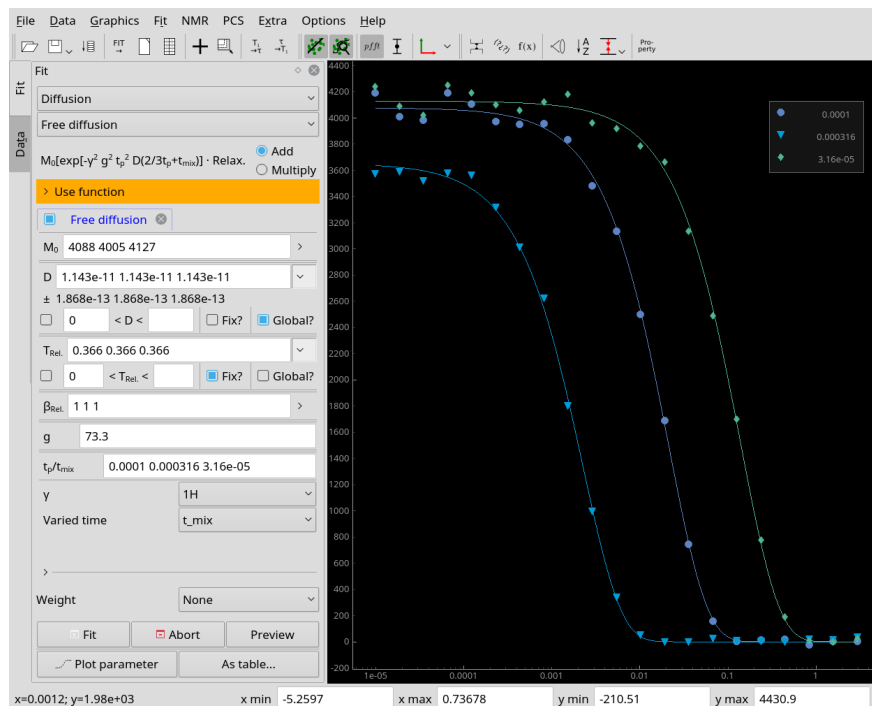


Bild A.3: Dialog zur Anpassung freier Diffusion.

Bereits implementiert sind Funktionen zur Beschreibung von Spektren (Gaußkurve, Lorentzkurve, Pakespektrum,...), NMR-spezifische Funktionen zur Auswertung von Spin-Gitter-Relaxation, Stimulierten-Echo-Experimenten, verschiedene Diffusionsmodelle, zur Beschreibung von Field-Cycling-Daten, aber auch Funktionen zur Anpassung der komplexen dielektrischen Permittivität (Gleichstromleitfähigkeit, Havriliak-Negami-Funktion,...), zur Beschreibung von Temperaturabhängigkeiten (Arrhenius- und VFT-Funktion) und allgemeine Funktionen wie Geraden oder Potenzgesetze.

Beim Schreiben des Auswerteprogramms wurde versucht, es dem Nutzer möglichst einfach zu machen, eigene Fitfunktionen hinzuzufügen. Dies geschieht durch Definition einer Klasse, wie sie in Quelltext A.1 am Beispiel der Fitfunktion freier Diffusion gezeigt ist, die in einer dafür vorgesehenen Datei *myfitmodels.py* gespeichert wird. Neue Fitfunktionen können dabei im laufenden Programm ohne Neustart hinzugefügt werden.

Am Beispiel des hier gezeigten Quelltexts soll kurz der Aufbau einer solchen Klasse erläutert werden, der innerhalb des Programms in Bild A.3 resultiert. Jede definierte Klasse benötigt einige Klassenvariablen zur korrekten Einordnung, Darstellung und Verarbeitung der Fitfunktion:

type, name (Zeilen 5,6)

Variablen, die zur Einordnung in den Drop-down-Menüs genutzt werden. *type* ist optional.

equation (Zeile 7)

Optionale Variable, die zur formatierten Darstellung der Fitfunktion gedacht ist. Die Eingabe von Sonderzeichen, griechische Buchstaben, hoch- und tiefergestellten Zeichen erfolgt wie im Formelsatz von \LaTeX .

params, Diffusion.ext_params (Zeilen 8,10)

Listen der Parameter, die an die Fitfunktion übergeben werden. In den Listen sind die Parameterbezeichnungen, die formatiert im Fenster bzw. beim Speichern der Parameter benutzt werden. *params* beinhaltet Parameter, die während der Anpassung variiert werden können, *ext_params* während der Anpassung nicht-variable Werte (z. B. Gradient g). Sind keine externe Parameter vorhanden, kann *ext_params* auch weggelassen werden.

bounds (Zeile 9)

Optionale Variable, die Standardschranken für die Parameter aus *params* festlegt. Pro Parameter in *params* enthält die Liste das Tupel (untere Schranke, obere Schranke), wobei **None** benutzt wird, wenn keine Grenze gesetzt werden soll.

choices (Zeile 11)

Optionale Variable, die eine Liste von Parametern beinhaltet, die über Drop-down-Menüs ausgewählt werden sollen. Im Beispiel sind dies das gyromagnetische Verhältnis γ sowie mit 'Varied time' die Festlegung, ob Diffusionsmessungen in Abhängigkeit von Mischzeit t_m oder Evolutionszeit t_p durchgeführt worden sind. Die Elemente der einzelnen Menüs werden durch ('Anzeige': Parameter der Funktion) festgelegt.

func (Zeilen 14 bis 28)

Die eigentliche Fitfunktion, die im einfachsten Fall die Form $\text{func}(p, x)$ hat, wobei

Quelltext A.1: Freie Diffusion als Beispiel einer Fitfunktion. Optionale Argumente sind kursiv.

```

1 import numpy as np
2 from auswerten.utils.constant import gamma
3
4 class Diffusion(object):
5     1 type = 'Diffusion'
6     2 name = 'Free diffusion'
7     3 equation = r'M_{0}[exp[-\gamma^{2} g^{2} t_{p}^{2}
      ↪ D(2/3t_{p}+t_{mix})] * Relax.]'
8
9     6 params = [r'M_{0}', r'D', r'T_{Rel.}', r'\beta_{Rel.}']
10    7 bounds = [(0, None), (0, None), (0, None), (0, 1)]
11    10 ext_params = [r'g', r't_{p}/t_{mix}']
12
13    11 choices = [(r'\gamma', gamma),
14                 (r'Varied time', {'t_mix': 'tm', 't_p': 'tp'})]
15
16    @staticmethod
17    def func(p, x, nucleus, t_axis):
18        m0, d, t_rel, beta_rel, grad, tevo = p
19        if t_axis == 'tm': # mixing time is varied, relaxation is T1
20            tm = x
21            tp = tevo
22            red = np.exp(-(tm/t_rel)**beta_rel)
23        else: # evolution time is varied, relaxation is T2
24            tm = tevo
25            tp = x
26            red = np.exp(-(2*tp/t_rel)**beta_rel)
27
28        q2 = (grad * nucleus * tp)**2
29        t_eff = (2*tp)/3 + tm
30
31        return m0 * np.exp(-q2 * d * t_eff) * red

```

in `p` die Werte der entsprechenden Parameter aus `params` und `ext_params` enthalten sind. Existiert die Variable `choices`, muss der Funktion für jedes Element von `choices` ein zusätzlicher Parameter übergeben werden. Im Beispiel freier Diffusion hat die Funktion daher die Form `func(p, x, nucleus, t_axis)` mit den Parametern `nucleus` für das gyromagnetische Verhältnis des gewählten Isotops und `t_axis` für die Festlegung der x -Achse. Durch die Einschränkung möglicher Parameter in `choices` auf wenige Werte ist eine Kontrolle der Ausgabewerte der Fitfunktion stark vereinfacht.

B. KORRELATIONSZEITENVERTEILUNGEN

Wie in Abschnitt 3.1 ausgeführt, lassen sich bei bekannter Verteilung von Korrelationszeiten $G(\ln \tau)$ immer die Korrelationsfunktion $C(t)$, die Suszeptibilität $\chi(\omega)$ und die spektrale Dichte $J(\omega)$ als Superposition von Debye-Prozessen

$$X = \int_{-\infty}^{\infty} G(\ln \tau) X_{\text{Debye}} d\ln \tau \quad (\text{B.1})$$

berechnen. Die Größen des Debye-Prozesses sind

$$C(t) = \exp[-t/\tau], \quad (\text{B.2})$$

$$\chi(\omega) = (1 + i\omega\tau)^{-1} \text{ und} \quad (\text{B.3})$$

$$J(\omega) = \{\tau/[1 + (\omega\tau)^2]\}^{-1}. \quad (\text{B.4})$$

Auf diese Art und Weise werden in dieser Arbeit die entsprechenden Größen für den Fall der Log-Gauß-Verteilung berechnet.

B.1 Havriliak-Negami-, Cole-Cole-, Cole-Davidson-Funktion

Die Havriliak-Negami-, Cole-Cole-, Cole-Davidson-Verteilungen sind einfacher in der Berechnung, da sie in geschlossener Form dargestellt werden können. Die Suszeptibilitäten dieser Modelle wurde bereits in Abschnitt 3.1 eingeführt. Die Verteilungen, die zu diesen Formen führen, sind

$$G(\ln \tau) = \begin{cases} \frac{(\tau/\tau_0)^{\alpha\gamma} \sin\left\{\gamma \arctan\left[\frac{\sin(\alpha\pi)}{(\tau/\tau_0)^\alpha + \cos(\alpha\pi)}\right]\right\}}{\pi[1+2(\tau/\tau_0)^\alpha \cos(\alpha\pi) + (\tau/\tau_0)^{2\alpha}]^{\gamma/2}} & \text{Havriliak-Negami,}^{505} \\ \begin{cases} \frac{\sin(\gamma\pi)}{\pi} \left[\frac{\tau}{\tau_0 - \tau}\right]^\gamma & \tau < \tau_0 \\ 0 & \tau \geq \tau_0 \end{cases} & \text{Cole-Davidson,}^{212} \\ \frac{\sin(\alpha\pi)}{2\pi\{\cosh[\alpha \ln(\tau/\tau_0)] + \cos(\alpha\pi)\}} & \text{Cole-Cole.}^{506} \end{cases} \quad (\text{B.5})$$

Die spektralen Dichten lassen sich entweder aus der Suszeptibilität ableiten oder direkt über

$$J(\omega) = \begin{cases} \frac{\sin\left\{\gamma \arctan\left[\frac{(\omega\tau_0)^\alpha \sin(\alpha\pi/2)}{1 + (\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2)}\right]\right\}}{\omega[1+2(\omega\tau_0)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau_0)^{2\alpha}]^{\gamma/2}} & \text{Havriliak-Negami}^{506} \\ \frac{\sin[\gamma \arctan(\omega\tau)]}{\omega[1+(\omega\tau)^2]^{\gamma/2}} & \text{Cole-Davidson,}^{506} \\ \frac{\sin(\alpha\pi/2)(\omega\tau_0)^\alpha}{\omega[1+2(\omega\tau_0)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau_0)^{2\alpha}]} & \text{Cole-Cole}^{506} \end{cases} \quad (\text{B.6})$$

darstellen. Die entsprechenden Korrelationsfunktionen sind

$$C(t) = \begin{cases} 1 - \left(\frac{t}{\tau_0}\right)^{\alpha\gamma} E_{\alpha, \alpha\gamma+1}^{\gamma} \left[-\left(\frac{t}{\tau_0}\right)^{\alpha}\right] & \text{Havriliak-Negami,}^{507} \\ \frac{1}{\Gamma(\gamma)} \Gamma\left(\gamma, \frac{t}{\tau_0}\right) & \text{Cole-Davidson,}^{213} \\ E_{\alpha} \left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^{\alpha}\right] & \text{Cole-Cole.}^{507} \end{cases} \quad (\text{B.7})$$

In diesen Gleichungen bezeichnen $E_{a,b}^g(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\Gamma(g+k)z^k}{k! \Gamma(az+b)}$ die dreiparametrische Mittag-Leffler-Funktion, $E_a(z) = E_{a,1}^0 = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{z^k}{\Gamma(az+1)}$ die Mittag-Leffler-Funktion und $\Gamma(a, x) = \int_x^{\infty} y^{a-1} e^{-y} dy$ die unvollständige Gamma-Funktion.

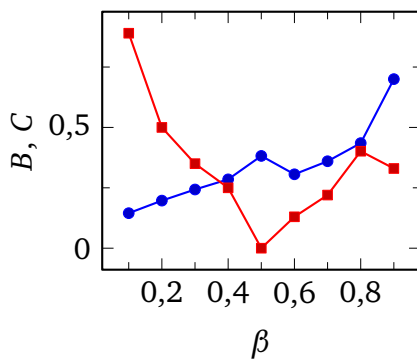
B.2 Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion

Die Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion in der Zeitdomäne $F(t) = \exp[-(t/\tau)^{\beta}]$ wurde mehrfach in dieser Arbeit erwähnt. Für die Beschreibung in der Frequenzdomäne durch $\chi(\omega)$ und $J(\omega)$ gibt es keine geschlossene analytische Form. Durch numerische Fouriertransformation sind aber auch diese Werte zugänglich.

Auch für die Verteilung von Korrelationszeiten der Kohlrausch-Williams-Watts-Funktion

$$G(\ln \tau) = -\frac{1}{\pi} \sum_{k=1}^{\infty} (-1)^k \frac{\Gamma(\beta k + 1)}{k!} \sin(\pi \beta k) \tau_0^{\beta k} \quad (\text{B.8})$$

existiert keine geschlossene Form, lässt sich aber im Bereich $0,1 \leq \beta \leq 0,9$ durch



$$G(\ln \tau) = \frac{B}{(\tau/\tau_0)^{(1-\beta/2)/(1-\beta)}} \times \exp\left[-\frac{(1-\beta)\beta^{\beta/(1-\beta)}}{(\tau/\tau_0)^{\beta/(1-\beta)}}\right] f(\tau) \quad (\text{B.9})$$

mit der Hilfsfunktion

$$f(\tau) = \begin{cases} 1/[1 + C(\tau/\tau_0)^{\beta(0,5-\beta)/(1-\beta)}] & \beta \leq 0,5 \\ 1 + C(\tau/\tau_0)^{\beta(\beta-0,5)/(1-\beta)} & \beta > 0,5 \end{cases}$$

Bild B.1: Parameter von Gleichung (B.9).

und den abgebildeten Parametern B und C nähern.⁵⁰⁸

B.3 Gewichtungsfaktor $W(T)$ mit Reduktionsfaktor

Ein Ansatz zur Beschreibung des Gewichtungsfaktors in Bild 7.27, der letztlich verworfen wurde, ist die Berücksichtigung des Einflusses eines Reduktionsfaktors auf die unterliegende Verteilung.

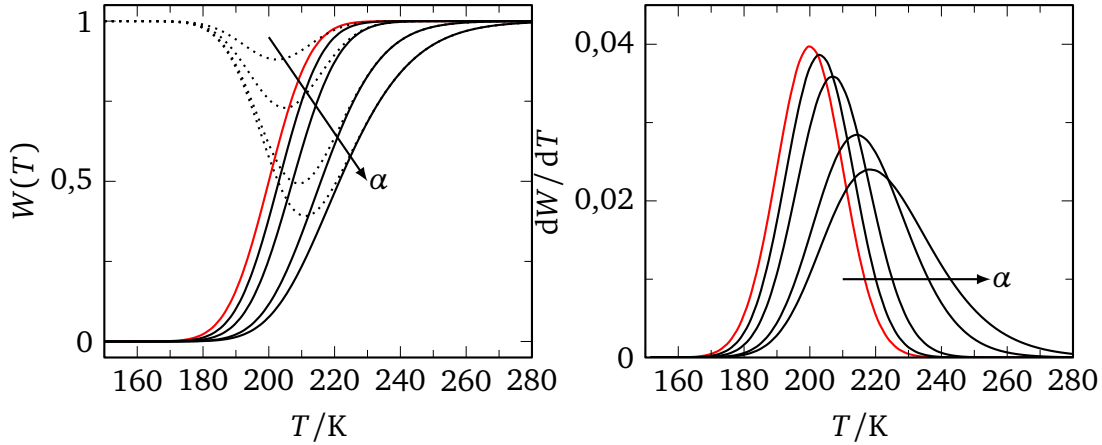


Bild B.2: Temperaturabhängigkeit des Gewichtungsfaktors $W(T)$ und der Ableitung dW/dT einer Energieverteilung bei Berücksichtigung des Reduktionsfaktors R mit unterschiedlichen Breiten $\alpha = 0,3, 0,7, 1,3, 2$. Gestrichelte Kurven stellen den Beitrag des Reduktionsfaktors dar (zweiter Term in Gleichung (B.13)) dar, schwarze Linie zeigt Gewichtungsfaktor ohne Reduktionsfaktor.

Ein Reduktionsfaktor R kann in Gleichung (3.66) über

$$W(T) = \int_{-\infty}^{\ln \tau^*} G(\ln \tau) [1 - R(\ln \tau)] d \ln \tau \quad (\text{B.10})$$

mit der oberen Grenze $\tau^* = 1/\delta$ berücksichtigt werden.²⁴⁰ Für den Fall, dass sowohl die Korrelationszeitenverteilung als auch der Reduktionsfaktor näherungsweise die Form einer Log-Gauß-Verteilung haben, d. h.

$$G(\ln \tau) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[\frac{\ln(\tau/\tau_m)}{\sigma} \right]^2 \right\}, \quad (\text{B.11a})$$

$$R(\ln \tau) = R_0 \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[\frac{\ln(\tau/\tau^*)}{\alpha} \right]^2 \right\}, \quad (\text{B.11b})$$

lässt sich der Gewichtungsfaktor zu

$$W(T) = \frac{1}{2} \operatorname{erfc} \left[\frac{\ln(\delta \tau_m)}{\sqrt{2}\sigma} \right] - \frac{R_0 \alpha}{2\sqrt{\alpha^2 + \sigma^2}} \exp \left[-\frac{\ln(\delta \tau_m)^2}{2(\alpha^2 + \sigma^2)} \right] \operatorname{erfc} \left[\frac{\alpha \ln(\delta \tau_m)}{\sqrt{2}\sigma \sqrt{\alpha^2 + \sigma^2}} \right] \quad (\text{B.12})$$

umformen. Hier bezeichnet erfc die komplementäre Fehlerfunktion $\operatorname{erfc}(x) = 1 + \operatorname{erf}(x) = \int_x^\infty e^{-x^2} dx$. Im Fall einer Verteilung von Energiebarrieren und einer Arrhenius-artigen Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten folgt daraus der Gewichtungsfaktor

$$W(T) = \frac{1}{2} \operatorname{erfc} \left(\frac{T_m - T}{\sqrt{2}\sigma_T} \right) - \frac{R_0 \beta T}{2\sqrt{\beta^2 T^2 + \sigma_T^2}} \exp \left[-\frac{(T_m - T)^2}{2(\beta^2 T^2 + \sigma_T^2)} \right] \operatorname{erfc} \left\{ \frac{\beta T (T_m - T)}{\sqrt{2}\sigma_T \sqrt{\beta^2 T^2 + \sigma_T^2}} \right\}, \quad (\text{B.13})$$

wobei die Variablen $T_m = \frac{E_m}{\ln(\tau^*/\tau_0)}$, $\sigma_T = \frac{\sigma_E}{\ln(\tau^*/\tau_0)}$ und $\beta = \frac{\alpha}{\ln(\tau^*/\tau_0)}$ eingeführt wurden. In Bild B.2 wird am Beispiel einer Verteilung mit $E_m = 6000 \text{ K}$, $\sigma_E = 500 \text{ K}$ der Einfluss durch den Reduktionsfaktor betrachtet. Der Vorfaktor τ_0 der Arrhenius-Gleichung ist hier so gewählt, dass die Korrelationszeit bei 200 K den Wert $10^{-6} \text{ s} = \tau^*$ hat. Mit zunehmender Breite α des Reduktionsfaktors steigt das Maximum und die Breite der apparenten Energieverteilung an. Zusätzlich nimmt die Rechtsschiefe der Verteilung mit größer werdendem Einfluss des Reduktionsfaktors zu. Im Gewichtungsfaktor steigt auch die Temperatur, bei der die Bedingung $W(T) = 0,5$ erfüllt ist, mit zunehmender Breite des Reduktionsfaktors an.

B.4 Vergleich Cole-Cole-Funktion und Verteilung von Aktivierungsenergien

In dieser Arbeit werden zur Berechnung von Korrelationszeiten unterschiedliche Annahmen getroffen. Einerseits wird bei der Auswertung der Neutronenstreudaten in Abschnitt 5 eine temperaturunabhängige Verteilung $G(E)$ von Energiebarrieren vorausgesetzt, die einer Verteilung von Korrelationszeiten mit temperaturabhängiger Breite entspricht. Andererseits werden bei der Berechnung von Korrelationszeiten aus Spin-Gitter-Relaxationszeiten u. a. in Abschnitt 6.1 symmetrische Verteilungen von Korrelationszeiten angenommen, deren Breiten temperaturunabhängig sind. Inwiefern die Annahme einer temperaturunabhängigen Verteilung von Korrelationszeiten in der NMR-Auswertung der Annahme einer temperaturunabhängigen Verteilung von Energiebarrieren widerspricht, soll im Folgenden betrachtet werden.

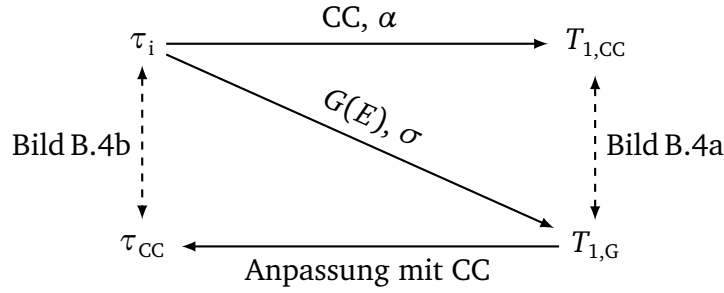


Bild B.3: Schema des Vergleichs von T_1 -Zeiten und Korrelationszeiten.

Dafür dienen als Ausgangspunkt Korrelationszeiten τ_i , die einem Arrhenius-Gesetz folgen mit $\tau_0 = 10^{-19}$ s und $E = 0,55$ eV. Aus diesen werden Spin-Gitter-Relaxationsraten über die Gleichung (3.60) bei einer Larmorfrequenz von $\omega_L = 2\pi \cdot 46$ MHz für ^2H mit Kopplungskonstanten $\delta = 2\pi \cdot 160$ kHz berechnet. Als spektrale Dichten werden einerseits eine Cole-Cole-Funktion mit $\alpha = 0,572$, andererseits eine Gaußverteilung von Energiebarrieren mit Verteilungsbreite $\sigma = 0,1$ eV benutzt. Die Breitenparameter sind so gewählt, dass in beiden Fällen die Höhe der berechneten T_1 -Minima übereinstimmen, wie in Bild B.4a abgebildet ist.

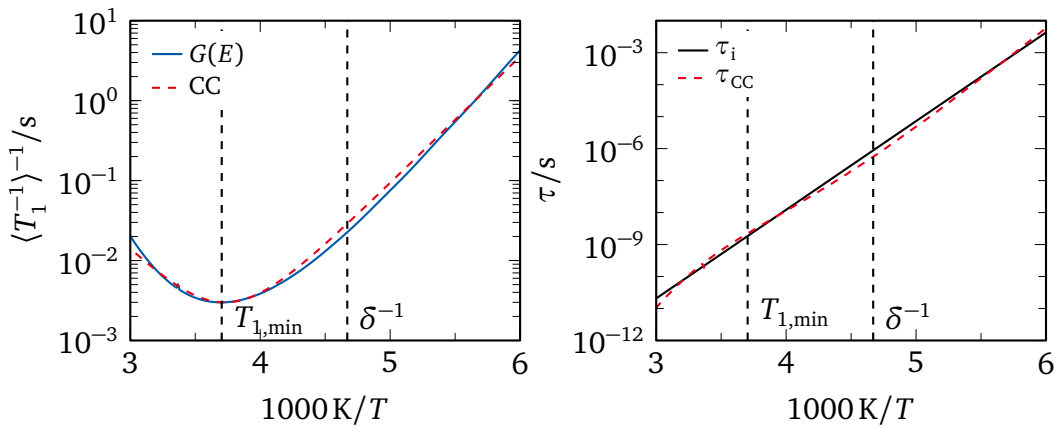


Bild B.4: (a) Spin-Gitter-Relaxationszeiten für Korrelationszeiten τ_i bei Annahme einer Verteilung von Energiebarrieren $G(E)$ sowie einer Cole-Cole-Spektraldichte mit $\alpha = 0,572$. (b) Korrelationszeiten τ_i zur Berechnung von T_1 und Korrelationszeiten τ_{cc} bei Auswertung der mit Verteilung $G(E)$ berechneten T_1 mit Cole-Cole-Spektraldichte.

Im Bereich des Minimums weisen beide Kurven eine große Ähnlichkeit auf, so dass bei experimentell gewonnenen Messdaten nicht auf die Form der spektrale Dichte geschlossen werden könnte. Die Unterschiede zwischen den Spektraldichten nehmen mit zunehmendem Abstand zum Minimum zu und sind im Bereich, in dem bei

experimentellen Daten ein Linienformübergang auftreten würde, am deutlichsten. Da in diesem Bereich Messungen allerdings eine reduzierte Signalstärke und entsprechend größere Fehler aufweisen, ist auch hier eine Unterscheidung zwischen den Spektraldichten anhand von T_1 -Daten schwierig.

Zusätzlich werden aus den Relaxationsraten, die unter Annahme einer Verteilung von Energiebarrieren erzeugt wurden, Korrelationszeiten auf die gleiche Weise wie aus experimentellen Daten gewonnen. Diese Korrelationszeiten bei Verwendung einer Cole-Cole-Funktion τ_{CC} sind zusammen mit den ursprünglich verwendeten Korrelationszeiten τ_i in Bild B.4b abgebildet. Abweichungen der angepassten Korrelationszeiten von den ursprünglich verwendeten sind sichtbar, die Temperaturabhängigkeit ist jedoch immer noch so, dass eine Beschreibung durch das Arrhenius-Gesetz mit vergleichbarer Aktivierungsenergie gerechtfertigt ist.

Die Auswertung von T_1 -Messungen zur Gewinnung von Korrelationszeiten mit einer Spektraldichte, deren unterliegende Verteilung eine temperaturunabhängige Breite hat, widerspricht also nicht der Annahme einer Verteilung von Energiebarrieren. Sie gibt zuverlässige Korrelationszeiten, da Stimulierte-Echo-Experimente und Linienformanalyse weitere Korrelationszeiten liefern, die modellunabhängig sind und ebenfalls die Temperaturabhängigkeit stützen können.

C. DIELEKTRISCHE SPEKTROSKOPIE

C.1 Nichtlinearität in dielektrischer Spektroskopie

Eine zu hohe Ladungsansammlung an der Elektrode kann zum Auftreten nichtlinearer Effekte führen, sollten die Ladungsträger beginnen miteinander zu wechselwirken. Elektrostatische Wechselwirkungen sind zu erwarten, wenn der Abstand kleiner als die Bjerrum-Länge λ_B ist. Um den Grad der Nichtlinearität abzuschätzen, wurde von Tudryn et al. daher die dimensionslose Größe

$$\frac{Q\lambda_B^2}{Aq} = \frac{qV}{k_B T} \sqrt{\frac{n\lambda_B^3}{16\pi}} \quad (C.1)$$

vorgeschlagen.⁴⁵⁶ In dieser Gleichung ist Q/A die angesammelte Ladung Q an der Oberfläche A der Elektrode, q die Ladung eines Ladungsträgers, n die Ladungsträgerdichte und V die angelegte Spannung. Sollen nichtlineare Einflüsse vermieden werden, muss dieser Parameter kleiner als Eins sein. Die Bjerrum-Länge lässt sich über

$$\lambda_B = \frac{q^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_s k_B T} \quad (C.2)$$

bei einer gegebenen Temperatur T aus der Permittivität ϵ_s vor dem Auftreten von Elektrodenpolarisation gewinnen. Die Ladungsträgerdichte n ist mit

$$n = \frac{1}{\pi\lambda_B L^2} \left(\frac{\tau_{EP}}{\tau_\sigma} \right)^2 \quad (C.3)$$

sowohl von der Probendicke L als auch von den Zeitkonstante τ_{EP} und τ_σ abhängig. Gleichung (C.1) lässt sich unter Ausnutzung von $\tau_\sigma = (\epsilon_0\epsilon_s)/\sigma_{DC}$ zu

$$\frac{Q\lambda_B^2}{Aq} = \frac{qV\lambda_B}{4\pi k_B T L} \frac{\tau_{EP}}{\tau_\sigma} \quad (C.4)$$

$$= \frac{q^3 V}{(4\pi k_B T)^2 L} \frac{\tau_{EP}}{\sigma_{DC} \tau_\sigma^2} \quad (C.5)$$

umformen. Die Probendicke L sowie die angelegte Spannung sind bekannte Größen, während τ_{EP} , τ_σ und σ_{DC} aus der Anpassung der Messdaten gewonnen werden können. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Werten $V = 3\text{ V}$ und $L = 0,409\text{ mm}$ und der Annahme $q = e$ ergibt sich die in Bild C.1 gezeigte Temperaturabhängigkeit. Die gewonnenen Werte sind aufgrund der Art der Auswertung fehlerbehaftet, dennoch lassen sich Schlüsse bezüglich nichtlinearer Effekte ziehen. Die 33 Mol-%-Probe ist mit Werten von $Q\lambda_B^2/(Aq) \approx 0,07$ deutlich im Regime der linearen Antwort,

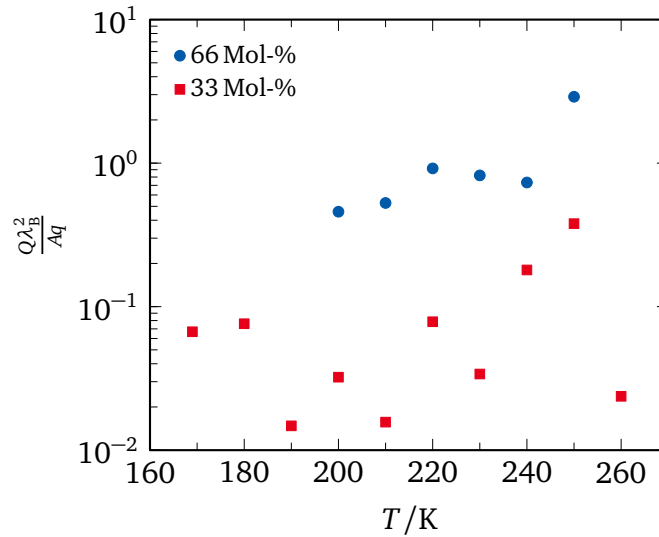


Bild C.1: Abschätzung der Nichtlinearität in dielektrischer Spektroskopie.

während die 66 Mol-%-Probe mit $Q\lambda_b^2/(Aq) \approx 0,7$ deutlich höher ist. Ob diese Erhöhung auf den höheren Wasseranteil des Lösungsmittels zurückzuführen ist oder eine andere Ursache hat, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden, ist aber auch keine Fragestellung dieser Arbeit. Die während der Messungen angelegte Spannung von 3 V ist für beide Proben noch im Bereich der linearen Antwort, wenn auch knapp im Fall der 66 Mol-%-Probe. Zukünftige Messungen an diesen oder anderen Protein-Lösungsmittel-Systemen sollten aber mit einer deutlich reduzierten Spannung durchgeführt werden.

C.2 Parameter der Elektrodenpolarisation

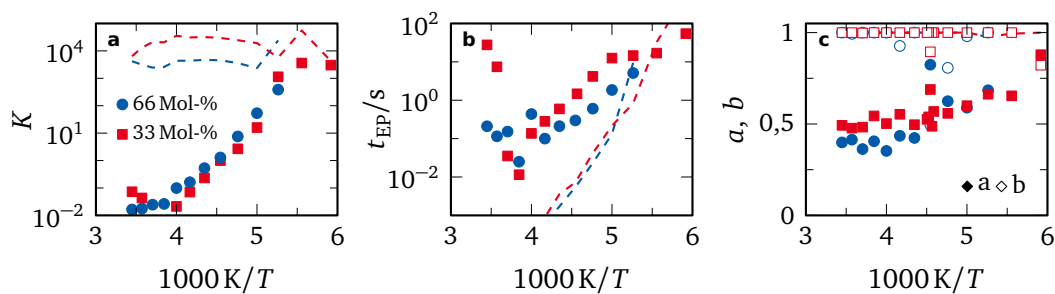


Bild C.2: Parameter der Elektrodenpolarisation aus Anpassung der dielektrischen Permittivität mit Gleichung (7.7): (a) K , (b) t_{EP} , (c) a , b . Gestrichelte Linien sind die entsprechenden Parameter von Prozess A ($\Delta\epsilon$, τ , α).

In der Auswertung der Lysozym-Lösungsmittel-Systeme in Abschnitt 7.2 wurde Elektrodenpolarisation mithilfe einer Havriliak-Negami-Funktion

$$Z_{\text{EP}}^*(\omega) = \frac{K}{[1 + (i\omega t_{\text{EP}})^a]^b} \quad (\text{C.6})$$

modelliert. Die Parameter der Anpassungen sind in Bild C.2 zusammen mit den Werten von Prozess A abgebildet (vgl. Bild 7.9 und Bild 7.10). Die Stärke K der Impedanz nimmt mit sinkender Temperatur zu. Die Elektrodenpolarisation ist im Vergleich zu Prozess A langsamer, besitzt jedoch eine schwächere Temperaturabhängigkeit, sodass die Zeitskalen sich bei etwa 180 K kreuzen. Die Streckungsparameter zeigen, dass die Elektrodenpolarisation hier durch eine Cole-Cole-Funktion beschrieben werden kann.

D. PROTEINSEQUENZEN UND AMINOSÄUREN

Zur Abschätzung des Anteils austauschbarer Wasserstoffe wurden aus der Proteindatenbank UniProt⁵⁰⁹ für Hühnerlysozym die Aminosäuresequenz (UniProt P00698)

MRSLLILVLC	FLPLAALGKV	FGRCELAAM	KRHGLDNYRG	YSLGNWVCAA	50
KFESNFNTQA	TNRNTDGSTD	YGILQINSRW	WCNDGRTPGS	RNLCNIPCSA	100
LLSSDITASV	NCAKKIVSDG	NGMNAWVAWR	NRCKGTDVQA	WIRGCRL	147

und für Rinderelastin die Sequenz (UniProt P04985)

MRSLTAAARR	PEVLLLLLCI	LQPSQPGGVP	GAVPGGVPGG	VFFPGAGLGG	50
LGVGGLPGV	KPAKPGVGGL	VGPGLGAEGS	ALPGAFFPGG	FGAGGGAAGA	100
AAAYKAAAKA	GAAGLGVGGI	GGVGGLGVST	GAVVPQLGAG	VGAGVKPGKV	150
PGVGLPGVYP	GGVLPGAGAR	FPGIGVLPGV	PTGAGVKPKA	QVGAGAFAGI	200
PGVGPFGGQ	PGLPLGYPIK	APKLPAGYGL	PYKTGKLPYG	FGPGGVAGSA	250
GKAGYPTGTG	VGPQAAAAAA	KAAAKLGAGG	AGVLPGVGVG	GPGIPGAPGA	300
IPGIGGIAGV	GAPDAAAAAA	AAAKAAKFGA	AGGLPGVGVP	GVGVPGVGVP	350
GVGVPGVGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGVGVP	GALSPAATAK	400
AAAKAAKFGA	RGAVGIGGIP	TFGLPGGGFP	GIGDAAAAPA	AAAAKAAKIG	450
AGVGALGGV	VPAGPGAIPG	LPGVGGVPGV	GIPAAAAAKA	AAKAAQFGLG	500
PGVGVPAGVG	VVPGVGVVPG	VGVAPGIGLG	PGGVIGAGVP	AAKSAAKAA	550
AKAQFRAAAG	LPAGVPGLGV	GAGVPGLGVG	AGVPGLGVGA	GVPGPAGVPG	600
TLAAAKAAKF	GPGGVGALGG	VGDLGGAGIP	GGVAGVVPAA	AAAAKAAAKA	650
AQFGLGGVGG	LGVGGLGAVP	GAVGLGGVSP	AAAAKAAKFG	AAGLGGVLGA	700
GQPFPIGGGA	GGLGVGGKPP	KPFGGALGAL	GFPGGACLGK	SCGRKRK	747

verwendet. Tabelle D.2 zeigt einen Überblick über die Seitenketten der kanonischen Aminosäuren und deren mögliche austauschbare Wasserstoffatome. Pro Aminosäure des Proteins befindet sich ein austauschbares Wasserstoffatom an der N–H-Bindung des Proteinrückgrats.

Bild D.1 zeigt die relativen Anteile aller Aminosäuren an den untersuchten Protein. Deutlich zu erkennen ist für Elastin die Konzentration auf Glycin, Alanin, Valin und Prolin, die zusammen über drei Viertel aller Aminosäuren ausmachen. Für Lysozym ragt hingegen keine Aminosäure heraus.

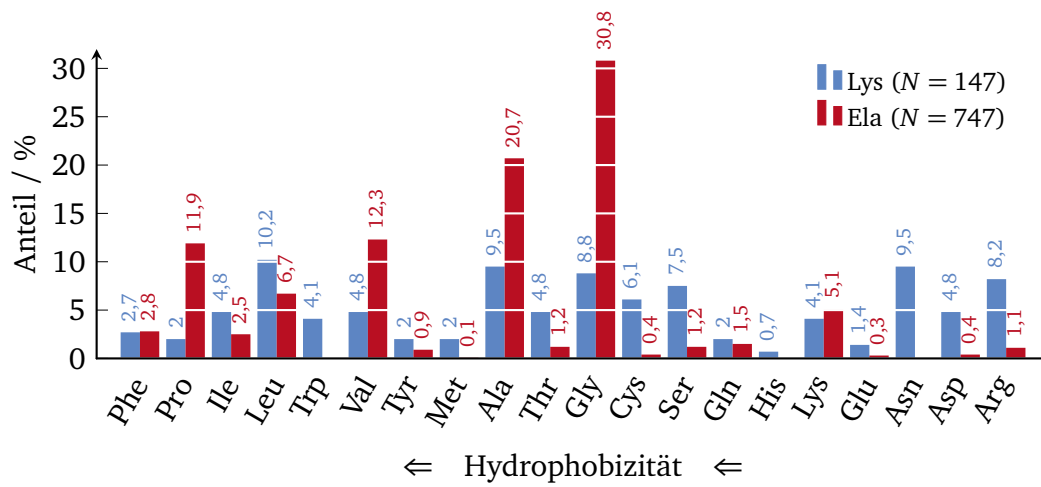


Bild D.1: Relative Anteile der Aminosäuren an den verwendeten Proteinen, sortiert nach abnehmender Hydrophobizität.⁵¹⁰

Tabelle D.2: Liste der 20 kanonischen Aminosäuren. Kursive Einträge besitzen austauschbare Wasserstoffatome in Seitenketten (Anzahl ist in Klammern angegeben).

Name	Abk.	Struktur	Name	Abk.	Struktur
Alanin	Ala / A	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_3 \diagdown$	Leucin	Leu / L	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{C}^{\delta 1} \text{H}_3 \\ \text{C}^{\delta 2} \text{H}_3 \end{matrix} \diagdown$
<i>Arginin</i> (5)	Arg / R	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \text{H}_2 - \text{C}^\delta \text{H}_2 - \text{NH} - \text{C}^\epsilon \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \oplus \\ \text{NH}_2 \end{matrix} \diagdown$	<i>Lysin</i> (2)	Lys / K	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \text{H}_2 - \text{C}^\delta \text{H}_2 - \text{C}^\epsilon \text{H}_2 - \text{NH}_2 \diagdown$
<i>Asparagin</i> (2)	Asn / N	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{matrix} \diagdown$	Methionin	Met / M	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \text{H}_2 - \text{S} - \text{C}^\epsilon \text{H}_3 \diagdown$
Asparaginsäure	Asp / D	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \ominus \end{matrix} \diagdown$	Prolin	Pro / P	$\begin{matrix} \text{C}^\delta \text{H}_2 \\ \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{C}^\alpha \text{H} \text{C}^\beta \text{H}_2 \end{matrix}$
Cystein	Cys / C	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{SH} \diagdown$	Phenylalanin	Phe / F	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{C}^\delta - \text{C}^\epsilon \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}^\delta - \text{C}^\epsilon \end{matrix} \diagdown$
<i>Glutamin</i> (2)	Gln / Q	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \text{H}_2 - \text{C}^\delta \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{matrix} \diagdown$	<i>Serin</i> (1)	Ser / S	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{OH} \diagdown$
Glutaminsäure	Glu / E	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \text{H}_2 - \text{C}^\delta \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \ominus \end{matrix} \diagdown$	Threonin	Thr / T	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \begin{matrix} \text{C}^\gamma \text{H}_3 \\ \text{OH} \end{matrix} \diagdown$
Glycin	Gly / G	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H}_2 \diagdown$	<i>Tryptophan</i> (1)	Trp / W	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{C}^{\delta 2} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}^{\delta 1} \text{NH} \end{matrix} \diagdown$
<i>Histidin</i> (1)	His / H	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{N} = \text{C}^{\epsilon 1} \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}^{\delta 2} \text{NH} \\ \text{H} \end{matrix} \diagdown$	<i>Tyrosin</i> (1)	Tyr / Y	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \text{H}_2 - \text{C}^\gamma \begin{matrix} \text{C}^\delta - \text{C}^\epsilon \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}^\delta - \text{C}^\epsilon \end{matrix} - \text{OH} \diagdown$
Isoleucin	Ile / I	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \begin{matrix} \text{C}^{\gamma 2} \text{H}_3 \\ \text{C}^{\gamma 1} \text{H}_2 - \text{C}^\delta \text{H}_3 \end{matrix} \diagdown$	Valin	Val / V	$\diagup \text{C}^\alpha \text{H} - \text{C}^\beta \begin{matrix} \text{C}^{\gamma 1} \text{H}_3 \\ \text{C}^{\gamma 2} \text{H}_3 \end{matrix} \diagdown$

E. PHASENZYKLEN

Die Verwendung von Phasenzyklen dient dazu, unerwünschte Signalbeiträge (z. B. durch falsche Drehwinkel von Pulsen) zu eliminieren. Signalartefakte, die durch die Messapparatur erzeugt werden, können durch Anwendung des CYCLOPS-Phasenzklus (Tabelle E.1) kompensiert werden.⁵¹¹ Existiert ein Phasenzklus zur Unterdrückung anderer Beiträge, müssen dessen Einzelschritte zusätzlich CYCLOPS durchlaufen, wenn Detektionsartefakte entfernt werden sollen.

Tabelle E.1: CYCLOPS-Phasenzklus.

	1	2	3	4
Puls	X	Y	−X	−Y
Detektion	X	Y	−X	−Y

Der Phasenzklus der CPMAS-Pulsfolge (Bild 3.15) hat zum Zweck, Beiträge, die durch die Einstrahlung des Pulses im Kohlenstoffkanal (^{13}C -CP) direkt angeregt werden, zu unterdrücken, während Beiträge durch Polarisationstransfer erhalten bleiben. Die Richtungen der Pulse im Protonenkanal (^1H -90°, ^1H -CP) im minimalen Phasenzklus (1–2) ist beliebig, lediglich der gleichzeitige Vorzeichenwechsel des 90°-Pulse und der Detektion muss durchgeführt werden. Verschachtelung mit dem CYCLOPS-Phasenzklus mit den Bestandteilen des Kohlenstoffkanals führt zum aufgelisteten Phasenzklus.

Tabelle E.2: CPMAS-Phasenzklus.⁵¹²

	1	2	3	4	5	6	7	8
^1H -90°	Y	−Y	Y	−Y	Y	−Y	Y	−Y
^1H -CP	X	X	X	X	X	X	X	X
^{13}C -CP	X	X	Y	Y	−X	−X	−Y	−Y
Detektion	X	−X	Y	−Y	−X	X	−Y	Y

Der minimale Phasenzklus des Festkörperechos (1–2) eliminiert Signalbeiträge, die durch den zweiten Puls in die Transversalebene gedreht werden. Zusammen mit CYCLOPS ergibt sich der aufgelistete Phasenzklus.

Tabelle E.3: Phasenzklus des Festkörperechos.²⁴³

	1	2	3	4	5	6	7	8
90°_1	X	X	Y	Y	-X	-X	-Y	-Y
90°_2	Y	-Y	-X	X	X	-X	-Y	Y
Detektion	Y	Y	-X	-X	-Y	-Y	X	X

Die für die Stimulierten-Echo-Experimente (Bild 3.13) aufgelisteten Phasenzyklen sind Minimalzyklen, um während der Mischzeit nur die gewünschten Speicherzustände \hat{I}_z im Zeeman- und \hat{T}_{20} im Spin-Alignment-Experiment zu erhalten. Die Kombination aus 1 und 2 erlaubt die Eliminierung von Magnetisierung, die sich während der Mischzeit durch Spin-Gitter-Relaxation aufbaut; 1 und 3 unterdrückt Signalbeiträge in der Transversalebene. Durch Drehung der Einstrahlrichtung der ersten beiden Pulse um 90° (1–5) werden unerwünschte Doppelquantenkohärenzen ausgelöscht. Die Kombination dieser verschiedenen Bestandteile führt zum achtstufigen Phasenzklus.

Tabelle E.4: Phasenzklus des Zeeman-Experiments.²⁴³

Zeeman	1	2	3	4	5	6	7	8
90°_1	X	-X	X	-X	Y	-Y	Y	-Y
90°_2	X	X	-X	-X	Y	Y	-Y	-Y
90°_3	X	X	X	X	X	X	X	X
Detektion	Y	-Y	-Y	Y	Y	-Y	-Y	Y

Tabelle E.5: Phasenzklus des Spin-Alignment-Experiments.²⁴³

Spin-Alignment	1	2	3	4	5	6	7	8
90°_1	X	-X	X	-X	Y	-Y	Y	-Y
45°_2	Y	Y	-Y	-Y	X	X	-X	-X
45°_3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Detektion	Y	-Y	-Y	Y	Y	-Y	-Y	Y

Im Fall, dass bei kurzen Evolutionszeiten ein vierter Puls zur Detektion eines Festkörperechos benötigt wird, verdoppelt sich die Länge des Phasenzklus. Der Phasenzklus des vierten Echopulses besteht aus acht 90° -Pulsen in Y-Richtung, gefolgt von acht Pulsen in -Y-Richtung, während die übrigen Pulse und Detektion den gegebenen Zyklus wiederholen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CC	Cole-Cole
CD	Cole-Davidson
CP	Kreuzpolarisation (engl. Cross Polarization)
CPE	Constant Phase Element
CPMAS	Kreuzpolarisation unter Magic Angle Spinning
CSA	Anisotroper Anteil der chemischen Verschiebung
CW	Continuous-Wave-Entkopplung
DS	Dielektrische Spektroskopie
EW	Excess Wing
FID	Freier Induktionszerfall (engl. Free Induction Decay)
HFF	Hochfrequenzflügel
HN	Havriliak-Negami
KWW	Kohlrausch-Williams-Watts
LG	Logarithmische Gaussverteilung
MAS	Magic Angle Spinning
ML	Mittag-Leffler-Funktion
NCL	Nearly Constant Loss
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
QENS	Quasielastische Neutronenstreuung
QP	Quadrupolare Wechselwirkung
RF	Radiofrequenz
RW	Random-Walk(-Simulationen)
SGR	Spin-Gitter-Relaxation
VFT	Vogel-Fulcher-Tammann

QUELLENVERZEICHNIS

- ¹ M. Uhlen, L. Fagerberg, . . . , F. Ponten: TISSUE-BASED MAP OF THE HUMAN PROTEOME. In: *Science* **347**, 1260419–1260419 (2015) [siehe S. 1].
- ² P. Zavodszky, J. Kardos, . . . , G. A. Petsko: ADJUSTMENT OF CONFORMATIONAL FLEXIBILITY IS A KEY EVENT IN THE THERMAL ADAPTATION OF PROTEINS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 7406–7411 (1998) [siehe S. 1].
- ³ P. Ball: WATER AS AN ACTIVE CONSTITUENT IN CELL BIOLOGY. In: *Chemical Reviews* **108**, 74–108 (2008) [siehe S. 1, 63].
- ⁴ J. A. Rupley, G. Careri: PROTEIN HYDRATION AND FUNCTION. In: *Advances in Protein Chemistry* **41**, 37–172 (1991) [siehe S. 1, 8, 11, 63].
- ⁵ J. A. Rupley, E. Gratton, G. Careri: WATER AND GLOBULAR PROTEINS. In: *Trends in Biochemical Sciences* **8**, 18–22 (1983) [siehe S. 1, 11].
- ⁶ J. G. Kempf, J. P. Loria: PROTEIN DYNAMICS FROM SOLUTION NMR. In: *Cell Biochemistry and Biophysics* **37**, 187–212 (2002) [siehe S. 1].
- ⁷ B. Halle: PROTEIN HYDRATION DYNAMICS IN SOLUTION: A CRITICAL SURVEY. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **359**, 1207–1224 (2004) [siehe S. 1, 8, 11, 128].
- ⁸ J. T. King, K. J. Kubarych: SITE-SPECIFIC COUPLING OF HYDRATION WATER AND PROTEIN FLEXIBILITY STUDIED IN SOLUTION WITH ULTRAFAST 2D-IR SPECTROSCOPY. In: *Journal of the American Chemical Society* **134**, 18705–18712 (2012) [siehe S. 1, 13].
- ⁹ M. Wolf, R. Gulich, . . . , A. Loidl: RELAXATION DYNAMICS OF A PROTEIN SOLUTION INVESTIGATED BY DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1824**, 723–730 (2012) [siehe S. 1, 113, 122, 123, 153, 156].
- ¹⁰ R. Biehl, D. Richter: SLOW INTERNAL PROTEIN DYNAMICS IN SOLUTION. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **26**, 503103 (2014) [siehe S. 1].
- ¹¹ S. B. Zimmerman, A. P. Minton: MACROMOLECULAR CROWDING: BIOCHEMICAL, BIOPHYSICAL, AND PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**, 27–65 (1993) [siehe S. 1].
- ¹² R. Ellis: MACROMOLECULAR CROWDING: OBVIOUS BUT UNDERAPPRECIATED. In: *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 597–604 (2001) [siehe S. 1].
- ¹³ S. N. Timasheff: PROTEIN–SOLVENT PREFERENTIAL INTERACTIONS, PROTEIN HYDRATION, AND THE MODULATION OF BIOCHEMICAL REACTIONS BY SOLVENT COMPONENTS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 9721–9726 (2002) [siehe S. 1, 17].
- ¹⁴ M. Gao, C. Held, . . . , R. Winter: CROWDERS AND COSOLVENTS — MAJOR CONTRIBUTORS TO THE CELLULAR MILIEU AND EFFICIENT MEANS TO COUNTERACT ENVIRONMENTAL STRESSES. In: *ChemPhysChem* **18**, 2951–2972 (2017) [siehe S. 1].
- ¹⁵ W. Doster, S. Cusack, W. Petry: DYNAMICAL TRANSITION OF MYOGLOBIN REVEALED BY INELASTIC NEUTRON SCATTERING. In: *Nature* **337**, 754–756 (1989) [siehe S. 1, 14, 52].
- ¹⁶ M. Vogel: ORIGINS OF APPARENT FRAGILE-TO-STRONG TRANSITIONS OF PROTEIN HYDRATION WATERS. In: *Physical Review Letters* **101**, 225701 (2008) [siehe S. 1, 13, 16, 70, 71, 80, 81, 83, 85, 87, 96, 97, 100, 104, 122, 129, 133, 135–137, 157, 158, 160].
- ¹⁷ H. Jansson, J. Swenson: THE PROTEIN GLASS TRANSITION AS MEASURED BY DIELECTRIC SPECTROSCOPY AND DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 20–26 (2010) [siehe S. 1, 10, 13, 59, 65, 70, 80, 82, 83, 85, 90].

- ¹⁸H. Frauenfelder, G. Chen, ..., R.D. Young: A UNIFIED MODEL OF PROTEIN DYNAMICS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 5129–5134 (2009) [siehe S. 1, 2, 15, 70, 84, 91, 107, 126, 159, 161].
- ¹⁹W. Doster: THE DYNAMICAL TRANSITION OF PROTEINS, CONCEPTS AND MISCONCEPTIONS. In: *European Biophysics Journal* **37**, 591–602 (2008) [siehe S. 1, 122, 126].
- ²⁰S. Khodadadi, J.H. Roh, ..., A.P. Sokolov: DYNAMICS OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES: NOT A SIMPLE SLAVING BY HYDRATION WATER. In: *Biophysical Journal* **98**, 1321–1326 (2010) [siehe S. 1, 15, 85, 94, 108].
- ²¹S. Capaccioli, K.L. Ngai, ..., N. Shinyashiki: THE ROLE OF PRIMITIVE RELAXATION IN THE DYNAMICS OF AQUEOUS MIXTURES, NANO-CONFINED WATER AND HYDRATED PROTEINS. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **357**, 641–654 (2011) [siehe S. 1].
- ²²W. Doster: ARE PROTEINS DYNAMICALLY HETEROGENEOUS? NEUTRON SCATTERING ANALYSIS OF HYDROGEN DISPLACEMENT DISTRIBUTIONS. In: *International Journal of Molecular and Theoretical Physics* **2**, 1–14 (2018) [siehe S. 1, 11].
- ²³W. Doster: THE PROTEIN–SOLVENT GLASS TRANSITION. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 3–14 (2010) [siehe S. 1, 11, 14–16, 83, 84, 129, 136, 138, 153, 159, 160].
- ²⁴S. Capaccioli, K.L. Ngai, ..., L.-M. Wang: THE JG β -RELAXATION IN WATER AND IMPACT ON THE DYNAMICS OF AQUEOUS MIXTURES AND HYDRATED BIOMOLECULES. In: *The Journal of Chemical Physics* **151**, 034504 (2019) [siehe S. 1, 16, 84, 153, 160].
- ²⁵K.L. Ngai, S. Capaccioli, A. Paciaroni: DYNAMICS OF HYDRATED PROTEINS AND BIO-PROTECTANTS: CAGED DYNAMICS, α -RELAXATION, AND β -RELAXATION. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1861**, 3553–3563 (2017) [siehe S. 1, 13–16, 70, 74, 83, 111, 126, 152, 153, 160, 163].
- ²⁶S. Capaccioli, K.L. Ngai, ..., A. Paciaroni: EVIDENCE OF COEXISTENCE OF CHANGE OF CAGED DYNAMICS AT T_G AND THE DYNAMIC TRANSITION AT T_D IN SOLVATED PROTEINS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 1745–1757 (2012) [siehe S. 1, 14, 70, 74, 83].
- ²⁷V. Samouillan, D. Tintar, C. Lacabanne: HYDRATED ELASTIN: DYNAMICS OF WATER AND PROTEIN FOLLOWED BY DIELECTRIC SPECTROSCOPES. In: *Chemical Physics* **385**, 19–26 (2011) [siehe S. 1, 2, 13, 70, 71, 81, 82, 84, 85, 87, 89, 93, 123, 153, 156].
- ²⁸A. Panagopoulou, A. Kyritsis, ..., P. Pissis: GLASS TRANSITION AND DYNAMICS IN LYSOZYME–WATER MIXTURES OVER WIDE RANGES OF COMPOSITION. In: *Food Biophysics* **6**, 199–209 (2011) [siehe S. 1, 10, 63, 64, 85, 109–112, 122, 126, 157].
- ²⁹B. F. Rasmussen, A. M. Stock, ..., G. A. Petsko: CRYSTALLINE RIBONUCLEASE A LOSES FUNCTION BELOW THE DYNAMICAL TRANSITION AT 220 K. In: *Nature* **357**, 423–424 (1992) [siehe S. 2, 14].
- ³⁰M. Ferrand, A. J. Dianoux, ..., G. Zaccai: THERMAL MOTIONS AND FUNCTION OF BACTERIORHODOPSIN IN PURPLE MEMBRANES: EFFECTS OF TEMPERATURE AND HYDRATION STUDIED BY NEUTRON SCATTERING. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 9668–9672 (1993) [siehe S. 2, 14].
- ³¹G. Strauss, E. P. Ingenito: STABILIZATION OF LIPOSOME BILAYERS TO FREEZING AND THAWING: EFFECTS OF CRYOPROTECTIVE AGENTS AND MEMBRANE PROTEINS. In: *Cryobiology* **17**, 508–515 (1980) [siehe S. 2, 63].
- ³²J. Bakhach: THE CRYOPRESERVATION OF COMPOSITE TISSUES. In: *Organogenesis* **5**, 119–126 (2009) [siehe S. 2].
- ³³W. Si, P. Zheng, ..., W. Ji: EFFECT OF GLYCEROL AND DIMETHYL SULFOXIDE ON CRYOPRESERVATION OF RHESUS MONKEY (MACACA MULATTA) SPERM. In: *American Journal of Primatology* **62**, 301–306 (2004) [siehe S. 2, 63].

- ³⁴ K. M. J. Rexer-Huber, P. J. Bishop, D. A. Wharton: SKIN ICE NUCLEATORS AND GLYCEROL IN THE FREEZING-TOLERANT FROG *LITORIA EWINGII*. In: *Journal of Comparative Physiology B* **181**, 781–792 (2011) [siehe S. 2, 63].
- ³⁵ V. Samouillan, C. André, ..., C. Lacabanne: EFFECT OF WATER ON THE MOLECULAR MOBILITY OF ELASTIN. In: *Biomacromolecules* **5**, 958–964 (2004) [siehe S. 2, 10, 63, 64, 71].
- ³⁶ S. Khodadadi, S. Pawlus, A. P. Sokolov: INFLUENCE OF HYDRATION ON PROTEIN DYNAMICS: COMBINING DIELECTRIC AND NEUTRON SCATTERING SPECTROSCOPY DATA. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 14273–14280 (2008) [siehe S. 2].
- ³⁷ S. A. Lusceac, M. Rosenstihl, ..., R. Böhmer: NMR AND DIELECTRIC STUDIES OF HYDRATED COLLAGEN AND ELASTIN: EVIDENCE FOR A DELOCALIZED SECONDARY RELAXATION. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **357**, 655–663 (2011) [siehe S. 2, 79, 80, 96, 109, 133].
- ³⁸ D. Sauer, B. Schuster, ..., M. Vogel: DYNAMICS OF WATER–ALCOHOL MIXTURES: INSIGHTS FROM NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE, BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY, AND TRIPLET SOLVATION DYNAMICS. In: *The Journal of Chemical Physics* **140**, 114503 (2014) [siehe S. 2, 109].
- ³⁹ M. Sattig, K. Elamin, ..., M. Vogel: DYNAMICS OF DiPGME–WATER MIXTURES IN MESOPOROUS SILICA. In: *The Journal of Physical Chemistry C* **121**, 6796–6806 (2017) [siehe S. 2, 95, 109].
- ⁴⁰ K. Kämpf: UNTERSUCHUNG VON PROTEIN- UND HYDRATIONSWASSERDYNAMIK MIT EXPERIMENTEN UND SIMULATIONEN. Dissertation, Technische Universität Darmstadt (2012) [siehe S. 2, 10, 67, 69, 79, 121, 123, 138].
- ⁴¹ A. Ansari, J. Berendzen, ..., R. D. Young: PROTEIN STATES AND PROTEINQUAKES. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 5000–5004 (1985) [siehe S. 4].
- ⁴² I. E. T. Iben, D. Braunstein, ..., R. D. Young: GLASSY BEHAVIOR OF A PROTEIN. In: *Physical Review Letters* **62**, 1916–1919 (1989) [siehe S. 4].
- ⁴³ J. L. Green, J. Fan, C. A. Angell: THE PROTEIN-GLASS ANALOGY: NEW INSIGHT FROM HOMOPOLYMER COMPARISONS. In: *The Journal of Physical Chemistry* **98**, 13780–13790 (1994) [siehe S. 4].
- ⁴⁴ C. A. Angell: FORMATION OF GLASSES FROM LIQUIDS AND BIOPOLYMERS. In: *Science* **267**, 1924–1935 (1995) [siehe S. 4, 7].
- ⁴⁵ P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, ..., R. D. Young: BULK-SOLVENT AND HYDRATION-SHELL FLUCTUATIONS, SIMILAR TO α - AND β -FLUCTUATIONS IN GLASSES, CONTROL PROTEIN MOTIONS AND FUNCTIONS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 14408–14413 (2004) [siehe S. 4, 10, 15, 91, 107, 126, 153, 161].
- ⁴⁶ M. Lagi, P. Baglioni, S.-H. Chen: LOGARITHMIC DECAY IN SINGLE-PARTICLE RELAXATION OF HYDRATED LYSOZYME POWDER. In: *Physical Review Letters* **103**, 015701 (2009) [siehe S. 4, 10].
- ⁴⁷ W. Götze, L. Sjogren: RELAXATION PROCESSES IN SUPERCOOLED LIQUIDS. In: *Reports on Progress in Physics* **55**, 241–376 (1992) [siehe S. 4].
- ⁴⁸ M. D. Ediger, C. A. Angell, S. R. Nagel: SUPERCOOLED LIQUIDS AND GLASSES. In: *The Journal of Physical Chemistry* **100**, 13200–13212 (1996) [siehe S. 4].
- ⁴⁹ C. A. Angell, K. L. Ngai, ..., S. W. Martin: RELAXATION IN GLASSFORMING LIQUIDS AND AMORPHOUS SOLIDS. In: *Journal of Applied Physics* **88**, 3113–3157 (2000) [siehe S. 4].
- ⁵⁰ P. Lunkenheimer, U. Schneider, ..., A. Loidl: GLASSY DYNAMICS. In: *Contemporary Physics* **41**, 15–36 (2000) [siehe S. 4, 22, 103, 114].
- ⁵¹ K. L. Ngai: DYNAMIC AND THERMODYNAMIC PROPERTIES OF GLASS-FORMING SUBSTANCES. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **275**, 7–51 (2000) [siehe S. 4, 7, 74, 111].
- ⁵² P. G. Debenedetti, F. H. Stillinger: SUPERCOOLED LIQUIDS AND THE GLASS TRANSITION. In: *Nature* **410**, 259–267 (2001) [siehe S. 4].

- ⁵³ R. Böhmer, G. Diezemann, ..., E. Rössler: DYNAMICS OF SUPERCOOLED LIQUIDS AND GLASSY SOLIDS. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **39**, 191–267 (2001) [siehe S. 4, 8, 22, 40, 129, 157].
- ⁵⁴ A. Cavagna: SUPERCOOLED LIQUIDS FOR PEDESTRIANS. In: *Physics Reports* **476**, 51–124 (2009) [siehe S. 4].
- ⁵⁵ L. Berthier, G. Biroli: THEORETICAL PERSPECTIVE ON THE GLASS TRANSITION AND AMORPHOUS MATERIALS. In: *Reviews of Modern Physics* **83**, 587–645 (2011) [siehe S. 4].
- ⁵⁶ M. D. Ediger, P. Harrowell: PERSPECTIVE: SUPERCOOLED LIQUIDS AND GLASSES. In: *The Journal of Chemical Physics* **137**, 080901 (2012) [siehe S. 4].
- ⁵⁷ P. Lunkenheimer, A. Loidl: GLASSY DYNAMICS: FROM MILLIHERTZ TO TERAHERTZ. In: *Advances in Dielectrics*. (2018), 23–59 [siehe S. 4].
- ⁵⁸ K. Niss, T. Hecksher: PERSPECTIVE: SEARCHING FOR SIMPLICITY RATHER THAN UNIVERSALITY IN GLASS-FORMING LIQUIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **149**, 230901 (2018) [siehe S. 4].
- ⁵⁹ D. Turnbull, M. H. Cohen: FREE-VOLUME MODEL OF THE AMORPHOUS PHASE: GLASS TRANSITION. In: *The Journal of Chemical Physics* **34**, 120–125 (1961) [siehe S. 4].
- ⁶⁰ G. Adam, J. H. Gibbs: ON THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF COOPERATIVE RELAXATION PROPERTIES IN GLASS-FORMING LIQUIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **43**, 139–146 (1965) [siehe S. 4].
- ⁶¹ M. Goldstein: VISCOUS LIQUIDS AND THE GLASS TRANSITION: A POTENTIAL ENERGY BARRIER PICTURE. In: *The Journal of Chemical Physics* **51**, 3728–3739 (1969) [siehe S. 4, 10].
- ⁶² F. H. Stillinger: A TOPOGRAPHIC VIEW OF SUPERCOOLED LIQUIDS AND GLASS FORMATION. In: *Science* **267**, 1935–1939 (1995) [siehe S. 4].
- ⁶³ W. Götze: THE ESSENTIALS OF THE MODE-COUPLING THEORY FOR GLASSY DYNAMICS. In: *Condensed Matter Physics* **1**, 873 (1998) [siehe S. 4].
- ⁶⁴ T. R. Kirkpatrick, D. Thirumalai, P. G. Wolynes: SCALING CONCEPTS FOR THE DYNAMICS OF VISCOUS LIQUIDS NEAR AN IDEAL GLASSY STATE. In: *Physical Review A* **40**, 1045–1054 (1989) [siehe S. 4].
- ⁶⁵ K. L. Ngai, R. W. Rendell: COOPERATIVE DYNAMICS IN RELAXATION: A COUPLING MODEL PERSPECTIVE. In: *Journal of Molecular Liquids* **56**, 199–214 (1993) [siehe S. 4, 15, 16].
- ⁶⁶ K. L. Ngai: RELATION BETWEEN SOME SECONDARY RELAXATIONS AND THE RELAXATIONS IN GLASS-FORMING MATERIALS ACCORDING TO THE COUPLING MODEL. In: *The Journal of Chemical Physics* **109**, 6982–6994 (1998) [siehe S. 4, 15].
- ⁶⁷ S. Mirigian, K. S. Schweizer: UNIFIED THEORY OF ACTIVATED RELAXATION IN LIQUIDS OVER 14 DECADES IN TIME. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters* **4**, 3648–3653 (2013) [siehe S. 4].
- ⁶⁸ W. Kauzmann: THE NATURE OF THE GLASSY STATE AND THE BEHAVIOR OF LIQUIDS AT LOW TEMPERATURES. In: *Chemical Reviews* **43**, 219–256 (1948) [siehe S. 4].
- ⁶⁹ W. T. Laughlin, D. R. Uhlmann: VISCOUS FLOW IN SIMPLE ORGANIC LIQUIDS. In: *The Journal of Physical Chemistry* **76**, 2317–2325 (1972) [siehe S. 5, 6].
- ⁷⁰ C. A. Angell, W. Sichina: THERMODYNAMICS OF THE GLASS TRANSITION: EMPIRICAL ASPECTS. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* **279**, 53–67 (1976) [siehe S. 5].
- ⁷¹ C. A. Angell: STRONG AND FRAGILE LIQUIDS. In: *Relaxation in Complex Systems*. Hrsg. von K. L. Ngai, G. B. Wright. Springfield (1985), 3–11 [siehe S. 5].
- ⁷² F. Qi, K. U. Schug, ..., H. Zimmermann: STRUCTURAL RELAXATION OF THE FRAGILE GLASS-FORMER PROPYLENE CARBONATE STUDIED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE. In: *The Journal of Chemical Physics* **112**, 9455–9462 (2000) [siehe S. 6].
- ⁷³ H. Vogel: THE LAW OF THE RELATIONSHIP BETWEEN VISCOSITY OF LIQUIDS AND THE TEMPERATURE. In: *Physikalische Zeitschrift* **22**, 645–646 (1921) [siehe S. 6].

- ⁷⁴ G. S. Fulcher: ANALYSIS OF RECENT MEASUREMENTS OF THE VISCOSITY OF GLASSES. In: *Journal of the American Ceramic Society* **8**, 339–355 (1925) [siehe S. 6].
- ⁷⁵ G. Tammann, W. Hesse: DIE ABHÄNGIGKEIT DER VISCOSITÄT VON DER TEMPERATUR BEI UNTERKÜHLTEN FLÜSSIGKEITEN. In: *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **156**, 245–257 (1926) [siehe S. 6].
- ⁷⁶ I. Avramov: VISCOSITY IN DISORDERED MEDIA. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **351**, 3163–3173 (2005) [siehe S. 6].
- ⁷⁷ Y. S. Elmatad, D. Chandler, J. P. Garrahan: CORRESPONDING STATES OF STRUCTURAL GLASS FORMERS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 5563–5567 (2009) [siehe S. 6].
- ⁷⁸ J. C. Mauro, Y. Yue, ..., D. C. Allan: VISCOSITY OF GLASS-FORMING LIQUIDS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 19780–19784 (2009) [siehe S. 6].
- ⁷⁹ B. Schmidtke, N. Petzold, ..., E. A. Rössler: FROM BOILING POINT TO GLASS TRANSITION TEMPERATURE: TRANSPORT COEFFICIENTS IN MOLECULAR LIQUIDS FOLLOW THREE-PARAMETER SCALING. In: *Physical Review E* **86**. (2012) [siehe S. 6].
- ⁸⁰ R. Kohlrausch: THEORIE DES ELEKTRISCHEN RÜCKSTANDES IN DER LEIDENER FLASCHE. In: *Annalen der Physik und Chemie* **167**, 56–82 (1854) [siehe S. 6, 20].
- ⁸¹ G. Williams, D. C. Watts: NON-SYMMETRICAL DIELECTRIC RELAXATION BEHAVIOUR ARISING FROM A SIMPLE EMPIRICAL DECAY FUNCTION. In: *Transactions of the Faraday Society* **66**, 80 (1970) [siehe S. 6, 20].
- ⁸² N. B. Olsen, T. Christensen, J. C. Dyre: TIME-TEMPERATURE SUPERPOSITION IN VISCOUS LIQUIDS. In: *Physical Review Letters* **86**, 1271–1274 (2001) [siehe S. 6].
- ⁸³ R. Böhmer, R. V. Chamberlin, ..., M. Wilhelm: NATURE OF THE NON-EXPONENTIAL PRIMARY RELAXATION IN STRUCTURAL GLASS-FORMERS PROBED BY DYNAMICALLY SELECTIVE EXPERIMENTS. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **235-237**, 1–9 (1998) [siehe S. 6, 65].
- ⁸⁴ M. T. Cicerone, M. D. Ediger: ENHANCED TRANSLATION OF PROBE MOLECULES IN SUPERCOOLED O-TERPHENYL: SIGNATURE OF SPATIALLY HETEROGENEOUS DYNAMICS? In: *The Journal of Chemical Physics* **104**, 7210–7218 (1996) [siehe S. 6].
- ⁸⁵ M. D. Ediger: SPATIALLY HETEROGENEOUS DYNAMICS IN SUPERCOOLED LIQUIDS. In: *Annual Review of Physical Chemistry* **51**, 99–128 (2000) [siehe S. 6].
- ⁸⁶ S. C. Glotzer: SPATIALLY HETEROGENEOUS DYNAMICS IN LIQUIDS: INSIGHTS FROM SIMULATION. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **274**, 342–355 (2000) [siehe S. 6].
- ⁸⁷ G. P. Johari, M. Goldstein: VISCOUS LIQUIDS AND THE GLASS TRANSITION. II. SECONDARY RELAXATIONS IN GLASSES OF RIGID MOLECULES. In: *The Journal of Chemical Physics* **53**, 2372–2388 (1970) [siehe S. 6].
- ⁸⁸ P. Lunkenheimer, R. Wehn, ..., A. Loidl: EXCESS WING IN THE DIELECTRIC LOSS OF GLASS FORMERS: FURTHER EVIDENCE FOR A β -RELAXATION. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **307-310**, 336–344 (2002) [siehe S. 7].
- ⁸⁹ R. Casalini, C. M. Roland: PRESSURE EVOLUTION OF THE EXCESS WING IN A TYPE-B GLASS FORMER. In: *Physical Review Letters* **91**. (2003) [siehe S. 7].
- ⁹⁰ K. L. Ngai, M. Paluch: CLASSIFICATION OF SECONDARY RELAXATION IN GLASS-FORMERS BASED ON DYNAMIC PROPERTIES. In: *The Journal of Chemical Physics* **120**, 857–873 (2004) [siehe S. 7].
- ⁹¹ C. Gainaru, R. Kahlau, ..., R. Böhmer: EVOLUTION OF EXCESS WING AND β -PROCESS IN SIMPLE GLASS FORMERS. In: *The Journal of Chemical Physics* **131**, 184510 (2009) [siehe S. 7].
- ⁹² A. Kudlik, S. Benkhof, ..., E. Rössler: THE DIELECTRIC RESPONSE OF SIMPLE ORGANIC GLASS FORMERS. In: *Journal of Molecular Structure* **479**, 201–218 (1999) [siehe S. 7, 10, 64, 114].

- ⁹³ K. Geirhos, P. Lunkenheimer, A. Loidl: JOHARI-GOLDSTEIN RELAXATION FAR BELOW T_g : EXPERIMENTAL EVIDENCE FOR THE GARDNER TRANSITION IN STRUCTURAL GLASSES? In: *Physical Review Letters* **120**. (2018) [siehe S. 7].
- ⁹⁴ T. Blochowicz, A. Kudlik, . . . , G. Hinze: THE SPECTRAL DENSITY IN SIMPLE ORGANIC GLASS FORMERS: COMPARISON OF DIELECTRIC AND SPIN-LATTICE RELAXATION. In: *The Journal of Chemical Physics* **110**, 12011–12022 (1999) [siehe S. 7, 38, 109, 111, 112].
- ⁹⁵ K. L. Ngai, M. Paluch: INFERENCE OF THE EVOLUTION FROM CAGED DYNAMICS TO COOPERATIVE RELAXATION IN GLASS-FORMERS FROM DIELECTRIC RELAXATION DATA. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **107**, 6865–6872 (2003) [siehe S. 7].
- ⁹⁶ R. M. Daniel, R. V. Dunn, . . . , J. C. Smith: THE ROLE OF DYNAMICS IN ENZYME ACTIVITY. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **32**, 69–92 (2003) [siehe S. 8, 14].
- ⁹⁷ M. Karplus, J. Kuriyan: MOLECULAR DYNAMICS AND PROTEIN FUNCTION. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 6679–6685 (2005) [siehe S. 8].
- ⁹⁸ K. Teilum, J. G. Olsen, B. B. Kragelund: FUNCTIONAL ASPECTS OF PROTEIN FLEXIBILITY. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 2231–2247 (2009) [siehe S. 8].
- ⁹⁹ M. A. Lillie, J. M. Gosline: THE EFFECTS OF HYDRATION ON THE DYNAMIC MECHANICAL PROPERTIES OF ELASTIN. In: *Biopolymers* **29**, 1147–1160 (1990) [siehe S. 8].
- ¹⁰⁰ J. Gosline, M. Lillie, . . . , K. Savage: ELASTIC PROTEINS: BIOLOGICAL ROLES AND MECHANICAL PROPERTIES. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **357**, 121–132 (2002) [siehe S. 8].
- ¹⁰¹ J. H. Roh, J. E. Curtis, . . . , A. P. Sokolov: INFLUENCE OF HYDRATION ON THE DYNAMICS OF LYSOZYME. In: *Biophysical Journal* **91**, 2573–2588 (2006) [siehe S. 8, 12, 14, 52, 53, 74, 76, 78, 121].
- ¹⁰² R. H. Valivety, P. J. Halling, A. R. Macrae: RHIZOMUCOR MIEHEI LIPASE REMAINS HIGHLY ACTIVE AT WATER ACTIVITY BELOW 0.0001. In: *FEBS Letters* **301**, 258–260 (1992) [siehe S. 8].
- ¹⁰³ P. A. Lind, R. M. Daniel, . . . , R. V. Dunn: ESTERASE CATALYSIS OF SUBSTRATE VAPOUR: ENZYME ACTIVITY OCCURS AT VERY LOW HYDRATION. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1702**, 103–110 (2004) [siehe S. 8].
- ¹⁰⁴ F.-X. Gallat, A. P. S. Brogan, . . . , M. Weik: A POLYMER SURFACTANT CORONA DYNAMICALLY REPLACES WATER IN SOLVENT-FREE PROTEIN LIQUIDS AND ENSURES MACROMOLECULAR FLEXIBILITY AND ACTIVITY. In: *Journal of the American Chemical Society* **134**, 13168–13171 (2012) [siehe S. 8].
- ¹⁰⁵ R. G. Bryant: THE DYNAMICS OF WATER-PROTEIN INTERACTIONS. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **25**, 29–53 (1996) [siehe S. 8].
- ¹⁰⁶ P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, . . . , F. G. Parak: SLAVING: SOLVENT FLUCTUATIONS DOMINATE PROTEIN DYNAMICS AND FUNCTIONS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16047–16051 (2002) [siehe S. 8, 15, 159].
- ¹⁰⁷ B. Bagchi: WATER DYNAMICS IN THE HYDRATION LAYER AROUND PROTEINS AND MICELLES. In: *Chemical Reviews* **105**, 3197–3219 (2005) [siehe S. 8, 11].
- ¹⁰⁸ K. Henzler-Wildman, D. Kern: DYNAMIC PERSONALITIES OF PROTEINS. In: *Nature* **450**, 964–972 (2007) [siehe S. 8, 10, 11].
- ¹⁰⁹ S. Khodadadi, A. P. Sokolov: PROTEIN DYNAMICS: FROM RATTLING IN A CAGE TO STRUCTURAL RELAXATION. In: *Soft Matter* **11**, 4984–4998 (2015) [siehe S. 8, 12, 13, 82, 121, 162].
- ¹¹⁰ M.-C. Bellissent-Funel, A. Hassanali, . . . , A. E. Garcia: WATER DETERMINES THE STRUCTURE AND DYNAMICS OF PROTEINS. In: *Chemical Reviews* **116**, 7673–7697 (2016) [siehe S. 8].

- ¹¹¹ D. Laage, T. Elsaesser, J. T. Hynes: WATER DYNAMICS IN THE HYDRATION SHELLS OF BIOMOLECULES. In: *Chemical Reviews* **117**, 10694–10725 (2017) [siehe S. 8].
- ¹¹² H. Hegyi, M. Gerstein: THE RELATIONSHIP BETWEEN PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION: A COMPREHENSIVE SURVEY WITH APPLICATION TO THE YEAST GENOME. In: *Journal of Molecular Biology* **288**, 147–164 (1999) [siehe S. 9].
- ¹¹³ C. M. Dobson: PROTEIN MISFOLDING, EVOLUTION AND DISEASE. In: *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 329–332 (1999) [siehe S. 9].
- ¹¹⁴ D. J. Selkoe: FOLDING PROTEINS IN FATAL WAYS. In: *Nature* **426**, 900–904 (2003) [siehe S. 9].
- ¹¹⁵ H. Hartmann, F. Parak, ..., H. Frauenfelder: CONFORMATIONAL SUBSTATES IN A PROTEIN: STRUCTURE AND DYNAMICS OF METMYOGLOBIN AT 80 K. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 4967–4971 (1982) [siehe S. 9].
- ¹¹⁶ R. Elber, M. Karplus: MULTIPLE CONFORMATIONAL STATES OF PROTEINS: A MOLECULAR DYNAMICS ANALYSIS OF MYOGLOBIN. In: *Science* **235**, 318–321 (1987) [siehe S. 9].
- ¹¹⁷ H. Frauenfelder, S. Sligar, P. Wolynes: THE ENERGY LANDSCAPES AND MOTIONS OF PROTEINS. In: *Science* **254**, 1598–1603 (1991) [siehe S. 9–11, 138].
- ¹¹⁸ G. Sartor, E. Mayer, G. Johari: CALORIMETRIC STUDIES OF THE KINETIC UNFREEZING OF MOLECULAR MOTIONS IN HYDRATED LYSOZYME, HEMOGLOBIN, AND MYOGLOBIN. In: *Biophysical Journal* **66**, 249–258 (1994) [siehe S. 10].
- ¹¹⁹ A. Panagopoulou, A. Kyritsis, ..., P. Pissis: GLASS TRANSITION AND DYNAMICS IN BSA–WATER MIXTURES OVER WIDE RANGES OF COMPOSITION STUDIED BY THERMAL AND DIELECTRIC TECHNIQUES. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1814**, 1984–1996 (2011) [siehe S. 10, 11, 13, 63, 64, 110, 122].
- ¹²⁰ M. Fomina, G. Schirò, A. Cupane: HYDRATION DEPENDENCE OF MYOGLOBIN DYNAMICS STUDIED WITH ELASTIC NEUTRON SCATTERING, DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY AND BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *Biophysical Chemistry* **185**, 25–31 (2014) [siehe S. 10, 16, 63, 64, 74, 110, 136, 157].
- ¹²¹ K. Kämpf, F. Klameth, M. Vogel: POWER-LAW AND LOGARITHMIC RELAXATIONS OF HYDRATED PROTEINS: A MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS STUDY. In: *The Journal of Chemical Physics* **137**, 205105 (2012) [siehe S. 10, 13, 22, 63, 128].
- ¹²² H. Frauenfelder, B. H. McMahon, ..., J. T. Groves: THE ROLE OF STRUCTURE, ENERGY LANDSCAPE, DYNAMICS, AND ALLOSTERY IN THE ENZYMIC FUNCTION OF MYOGLOBIN. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2370–2374 (2001) [siehe S. 10, 15, 159].
- ¹²³ D. Thorn Leeson, D. A. Wiersma, ..., J. Friedrich: THE ENERGY LANDSCAPE OF MYOGLOBIN: AN OPTICAL STUDY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 6331–6340 (1997) [siehe S. 10].
- ¹²⁴ M. Lüscher-Mattli, M. Rüegg: THERMODYNAMIC FUNCTIONS OF BIOPOLYMER HYDRATION. I. THEIR DETERMINATION BY VAPOR PRESSURE STUDIES, DISCUSSED IN AN ANALYSIS OF THE PRIMARY HYDRATION PROCESS. In: *Biopolymers* **21**, 403–418 (1982) [siehe S. 11].
- ¹²⁵ A. Krushelnitsky, T. Zinkevich, ..., D. Reichert: ¹³C AND ¹⁵N NMR STUDY OF THE HYDRATION RESPONSE OF T4 LYSOZYME AND B-CRYSTALLIN INTERNAL DYNAMICS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, (2009) [siehe S. 11, 13, 122, 138, 155, 158].
- ¹²⁶ J. Geske, M. Harrach, ..., M. Vogel: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF WATER, SILICA, AND AQUEOUS MIXTURES IN BULK AND CONFINEMENT. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **232**, 1187–1225 (2018) [siehe S. 11–13, 94, 104, 128, 162].
- ¹²⁷ A. Fillmer, C. Gainaru, R. Böhmer: BROADENED DIELECTRIC LOSS SPECTRA AND REDUCED DISPERSION STRENGTH OF VISCOUS GLYCEROL IN A CONNECTIVE TISSUE PROTEIN. In: *Jour-*

- nal of Non-Crystalline Solids* **356**, 743–746 (2010) [siehe S. 12, 21, 55, 65, 104, 121].
- ¹²⁸ F. Persson, P. Söderhjelm, B. Halle: THE SPATIAL RANGE OF PROTEIN HYDRATION. In: *The Journal of Chemical Physics* **148**, 215104 (2018) [siehe S. 11].
- ¹²⁹ R. E. Dehl: COLLAGEN: MOBILE WATER CONTENT OF FROZEN FIBERS. In: *Science* **170**, 738–739 (1970) [siehe S. 11].
- ¹³⁰ W. Doster, A. Bachleitner, ..., E. Lüscher: THERMAL PROPERTIES OF WATER IN MYOGLOBIN CRYSTALS AND SOLUTIONS AT SUBZERO TEMPERATURES. In: *Biophysical Journal* **50**, 213–219 (1986) [siehe S. 11].
- ¹³¹ G. Sartor, A. Hallbrucker, ..., E. Mayer: CALORIMETRIC GLASS–LIQUID TRANSITION AND CRYSTALLIZATION BEHAVIOR OF A VITREOUS, BUT FREEZABLE, WATER FRACTION IN HYDRATED METHEMOGLOBIN. In: *The Journal of Physical Chemistry* **96**, 5133–5138 (1992) [siehe S. 11, 110].
- ¹³² D. I. Svergun, S. Richard, ..., G. Zaccai: PROTEIN HYDRATION IN SOLUTION: EXPERIMENTAL OBSERVATION BY X-RAY AND NEUTRON SCATTERING. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 2267–2272 (1998) [siehe S. 11, 49].
- ¹³³ F. Merzel, J. C. Smith: IS THE FIRST HYDRATION SHELL OF LYSOZYME OF HIGHER DENSITY THAN BULK WATER? In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 5378–5383 (2002) [siehe S. 11].
- ¹³⁴ F. Persson, P. Söderhjelm, B. Halle: THE GEOMETRY OF PROTEIN HYDRATION. In: *The Journal of Chemical Physics* **148**, 215101 (2018) [siehe S. 11].
- ¹³⁵ F. Sterpone, G. Stirnemann, D. Laage: MAGNITUDE AND MOLECULAR ORIGIN OF WATER SLOWDOWN NEXT TO A PROTEIN. In: *Journal of the American Chemical Society* **134**, 4116–4119 (2012) [siehe S. 11].
- ¹³⁶ A. C. Fogarty, D. Laage: WATER DYNAMICS IN PROTEIN HYDRATION SHELLS: THE MOLECULAR ORIGINS OF THE DYNAMICAL PERTURBATION. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **118**, 7715–7729 (2014) [siehe S. 11].
- ¹³⁷ V. P. Denisov, B. Halle: PROTEIN HYDRATION DYNAMICS IN AQUEOUS SOLUTION. In: *Faraday Discussions* **103**, 227 (1996) [siehe S. 11, 128, 134].
- ¹³⁸ T. E. Dirama, G. A. Carri, A. P. Sokolov: COUPLING BETWEEN LYSOZYME AND GLYCEROL DYNAMICS: MICROSCOPIC INSIGHTS FROM MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS. In: *The Journal of Chemical Physics* **122**, 244910 (2005) [siehe S. 11, 14, 65, 87, 94, 104].
- ¹³⁹ R. Biswas, B. Bagchi: ANOMALOUS WATER DYNAMICS AT SURFACES AND INTERFACES: SYNERGISTIC EFFECTS OF CONFINEMENT AND SURFACE INTERACTIONS. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **30**, 013001 (2017) [siehe S. 11].
- ¹⁴⁰ F. Persson, P. Söderhjelm, B. Halle: HOW PROTEINS MODIFY WATER DYNAMICS. In: *The Journal of Chemical Physics* **148**, 215103 (2018) [siehe S. 11, 128].
- ¹⁴¹ G. Schiró, C. Caronna, ..., A. Cupane: DIRECT EVIDENCE OF THE AMINO ACID SIDE CHAIN AND BACKBONE CONTRIBUTIONS TO PROTEIN ANHARMONICITY. In: *Journal of the American Chemical Society* **132**, 1371–1376 (2010) [siehe S. 12, 14, 74, 76, 77].
- ¹⁴² M. T. F. Telling, L. Clifton, ..., V. García Sakai: LYOPHILISED PROTEIN DYNAMICS: MORE THAN JUST METHYLS? In: *Soft Matter* **8**, 9529 (2012) [siehe S. 12, 53, 76, 77].
- ¹⁴³ J. Colmenero, A. J. Moreno, A. Alegria: NEUTRON SCATTERING INVESTIGATIONS ON METHYL GROUP DYNAMICS IN POLYMERS. In: *Progress in Polymer Science* **30**, 1147–1184 (2005) [siehe S. 12, 76].
- ¹⁴⁴ J. D. Nickels, J. E. Curtis, ..., A. P. Sokolov: ROLE OF METHYL GROUPS IN DYNAMICS AND EVOLUTION OF BIOMOLECULES. In: *Journal of Biological Physics* **38**, 497–505 (2012) [siehe S. 12].
- ¹⁴⁵ K. Kämpf, B. Kremmling, M. Vogel: VANISHING AMPLITUDE OF BACKBONE DYNAMICS CAUSES A TRUE PROTEIN DYNAMICAL TRANSITION: ²H NMR STUDIES ON PERDEUTERATED C-PHYCOCYANIN. In: *Physical Review E* **89**,

- 032710 (2014) [siehe S. 12, 13, 78, 105, 137, 138, 157, 158].
- ¹⁴⁶ S. A. Lusceac, M. R. Vogel, C. R. Herbers: ^2H AND ^{13}C NMR STUDIES ON THE TEMPERATURE-DEPENDENT WATER AND PROTEIN DYNAMICS IN HYDRATED ELASTIN, MYOGLOBIN AND COLLAGEN. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 41–48 (2010) [siehe S. 13, 21, 42, 85, 96, 97, 133, 135, 136, 138, 152].
- ¹⁴⁷ C. R. Herbers, D. Sauer, M. Vogel: ^2H NMR STUDIES OF GLYCEROL DYNAMICS IN PROTEIN MATRICES. In: *The Journal of Chemical Physics* **136**, 124511 (2012) [siehe S. 13, 65, 93, 94, 97–100, 103, 104, 107, 122, 157].
- ¹⁴⁸ L. Hong, N. Smolin, ..., J. C. Smith: THREE CLASSES OF MOTION IN THE DYNAMIC NEUTRON-SCATTERING SUSCEPTIBILITY OF A GLOBULAR PROTEIN. In: *Physical Review Letters* **107**. (2011) [siehe S. 13, 122].
- ¹⁴⁹ L. Hong, X. Cheng, ..., J. C. Smith: SURFACE HYDRATION AMPLIFIES SINGLE-WELL PROTEIN ATOM DIFFUSION PROPAGATING INTO THE MACROMOLECULAR CORE. In: *Physical Review Letters* **108**. (2012) [siehe S. 13, 138].
- ¹⁵⁰ J. D. Nickels, V. Garcia Sakai, A. P. Sokolov: DYNAMICS IN PROTEIN POWDERS ON THE NANOSECOND–PICOSECOND TIME SCALE ARE DOMINATED BY LOCALIZED MOTIONS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **117**, 11548–11555 (2013) [siehe S. 13].
- ¹⁵¹ K. Wood, F.-X. Gallat, ..., F. A. A. Mulder: PROTEIN SURFACE AND CORE DYNAMICS SHOW CONCERTED HYDRATION-DEPENDENT ACTIVATION. In: *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 665–668 (2012) [siehe S. 13].
- ¹⁵² M. Tarek, D. J. Tobias: ROLE OF PROTEIN–WATER HYDROGEN BOND DYNAMICS IN THE PROTEIN DYNAMICAL TRANSITION. In: *Physical Review Letters* **88**. (2002) [siehe S. 13].
- ¹⁵³ R. Pethig: PROTEIN–WATER INTERACTIONS DETERMINED BY DIELECTRIC METHODS. In: *Annual Review of Physical Chemistry* **43**, 177–205 (1992) [siehe S. 13, 105, 122].
- ¹⁵⁴ S. Khodadadi, S. Pawlus, ..., A. P. Sokolov: THE ORIGIN OF THE DYNAMIC TRANSITION IN PROTEINS. In: *The Journal of Chemical Physics* **128**, 195106 (2008) [siehe S. 13, 16, 21, 52, 74, 112, 114, 136, 159, 160].
- ¹⁵⁵ M. Nakanishi, A. P. Sokolov: PROTEIN DYNAMICS IN A BROAD FREQUENCY RANGE: DIELECTRIC SPECTROSCOPY STUDIES. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **407**, 478–485 (2015) [siehe S. 13, 21, 70, 85, 96, 111, 122, 126, 134–137, 152, 162].
- ¹⁵⁶ T. Kleinert, W. Doster, ..., M. Settles: SOLVENT COMPOSITION AND VISCOSITY EFFECTS ON THE KINETICS OF CO BINDING TO HORSE MYOGLOBIN. In: *Biochemistry* **37**, 717–733 (1998) [siehe S. 13].
- ¹⁵⁷ A. Krushelnitsky, D. Reichert: RESPONSE OF LYSOZYME INTERNAL DYNAMICS TO HYDRATION PROBED BY ^{13}C AND ^1H SOLID-STATE NMR RELAXATION. In: *Applied Magnetic Resonance* **27**, 501–518 (2004) [siehe S. 13, 90, 156, 158].
- ¹⁵⁸ F. Massi: MICROSECOND TIMESCALE BACKBONE CONFORMATIONAL DYNAMICS IN UBIQUITIN STUDIED WITH NMR R_1 RELAXATION EXPERIMENTS. In: *Protein Science* **14**, 735–742 (2005) [siehe S. 13].
- ¹⁵⁹ O. F. Lange, N.-A. Lakomek, ..., B. L. de Groot: RECOGNITION DYNAMICS UP TO MICROSECONDS REVEALED FROM AN RDC-DERIVED UBIQUITIN ENSEMBLE IN SOLUTION. In: *Science* **320**, 1471–1475 (2008) [siehe S. 13].
- ¹⁶⁰ D. E. Shaw, P. Maragakis, ..., W. Wriggers: ATOMIC-LEVEL CHARACTERIZATION OF THE STRUCTURAL DYNAMICS OF PROTEINS. In: *Science* **330**, 341–346 (2010) [siehe S. 13].
- ¹⁶¹ K. Lindorff-Larsen, P. Maragakis, ..., D. E. Shaw: PICOSECOND TO MILLISECOND STRUCTURAL DYNAMICS IN HUMAN UBIQUITIN. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **120**, 8313–8320 (2016) [siehe S. 13].
- ¹⁶² M. Tarek, D. J. Tobias: THE ROLE OF PROTEIN–SOLVENT HYDROGEN BOND DYNAMICS IN THE STRUCTURAL RELAXATION OF A PROTEIN IN GLYCEROL VERSUS WATER. In: *European Bio-*

- physics Journal* **37**, 701–709 (2008) [siehe S. 13, 14, 52, 65, 87].
- ¹⁶³ A. M. Tsai, D. A. Neumann, L. N. Bell: MOLECULAR DYNAMICS OF SOLID-STATE LYSOZYME AS AFFECTED BY GLYCEROL AND WATER: A NEUTRON SCATTERING STUDY. In: *Biophysical Journal* **79**, 2728–2732 (2000) [siehe S. 14, 52].
- ¹⁶⁴ Y.-H. Kuo, Y.-W. Chiang: SLOW DYNAMICS AROUND A PROTEIN AND ITS COUPLING TO SOLVENT. In: *ACS Central Science* **4**, 645–655 (2018) [siehe S. 13, 15, 94, 108, 159].
- ¹⁶⁵ J. R. Lewandowski, M. E. Halse, ..., L. Emsley: DIRECT OBSERVATION OF HIERARCHICAL PROTEIN DYNAMICS. In: *Science* **348**, 578–581 (2015) [siehe S. 13].
- ¹⁶⁶ F. Demmel, W. Doster, ..., A. Schulte: VIBRATIONAL FREQUENCY SHIFTS AS A PROBE OF HYDROGEN BONDS: THERMAL EXPANSION AND GLASS TRANSITION OF MYOGLOBIN IN MIXED SOLVENTS. In: *European Biophysics Journal* **26**, 327–335 (1997) [siehe S. 13].
- ¹⁶⁷ K. D. Rector, J. R. Engholm, ..., M. D. Fayer: A DYNAMICAL TRANSITION IN THE PROTEIN MYOGLOBIN OBSERVED BY INFRARED VIBRATIONAL ECHO EXPERIMENTS. In: *The Journal of Physical Chemistry A* **103**, 2381–2387 (1999) [siehe S. 13].
- ¹⁶⁸ F. Lipps, S. Levy, A. G. Markelz: HYDRATION AND TEMPERATURE INTERDEPENDENCE OF PROTEIN PICOSECOND DYNAMICS. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**, 6375 (2012) [siehe S. 14].
- ¹⁶⁹ M. G. Mazza, K. Stokely, ..., G. Franzese: MORE THAN ONE DYNAMIC CROSSOVER IN PROTEIN HYDRATION WATER. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19873–19878 (2011) [siehe S. 14].
- ¹⁷⁰ F. Parak, E. Knapp, D. Kucheida: PROTEIN DYNAMICS: MÖSSBAUER SPECTROSCOPY ON DEOXYMYOGLOBIN CRYSTALS. In: *Journal of Molecular Biology* **161**, 177–194 (1982) [siehe S. 14].
- ¹⁷¹ D. Ringe, G. A. Petsko: THE ‘GLASS TRANSITION’ IN PROTEIN DYNAMICS: WHAT IT IS, WHY IT OCCURS, AND HOW TO EXPLOIT IT. In: *Biophysical Chemistry* **105**, 667–680 (2003) [siehe S. 14].
- ¹⁷² A. L. Lee, A. J. Wand: MICROSCOPIC ORIGINS OF ENTROPY, HEAT CAPACITY AND THE GLASS TRANSITION IN PROTEINS. In: *Nature* **411**, 501–504 (2001) [siehe S. 14].
- ¹⁷³ Z. Liu, J. Huang, ..., L. Hong: DYNAMICAL TRANSITION OF COLLECTIVE MOTIONS IN DRY PROTEINS. In: *Physical Review Letters* **119**, 048101 (2017) [siehe S. 14, 72, 74, 86].
- ¹⁷⁴ K. Ngai, L. Hong, ..., A. Paciaroni: UNCOVERING A NOVEL TRANSITION IN THE DYNAMICS OF PROTEINS IN THE DRY STATE. In: *Journal of Molecular Liquids* **286**, 110810 (2019) [siehe S. 14, 16, 74, 86, 158].
- ¹⁷⁵ G. Schiró, Y. Fichou, ..., M. Weik: TRANSLATIONAL DIFFUSION OF HYDRATION WATER CORRELATES WITH FUNCTIONAL MOTIONS IN FOLDED AND INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS. In: *Nature Communications* **6**, (2015) [siehe S. 14, 79].
- ¹⁷⁶ T. Becker, J. C. Smith: ENERGY RESOLUTION AND DYNAMICAL HETEROGENEITY EFFECTS ON ELASTIC INCOHERENT NEUTRON SCATTERING FROM MOLECULAR SYSTEMS. In: *Physical Review E* **67**, 021904 (2003) [siehe S. 14, 53, 71].
- ¹⁷⁷ S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto: MEAN SQUARE DISPLACEMENTS FROM ELASTIC INCOHERENT NEUTRON SCATTERING EVALUATED BY SPECTROMETERS WORKING WITH DIFFERENT ENERGY RESOLUTION ON DRY AND HYDRATED (H₂O AND D₂O) LYSOZYME. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 9268–9274 (2010) [siehe S. 14].
- ¹⁷⁸ G. Schiró, F. Natali, A. Cupane: PHYSICAL ORIGIN OF ANHARMONIC DYNAMICS IN PROTEINS: NEW INSIGHTS FROM RESOLUTION-DEPENDENT NEUTRON SCATTERING ON HOMOMERIC POLYPEPTIDES. In: *Physical Review Letters* **109**, (2012) [siehe S. 14, 85, 157].

- ¹⁷⁹ G. Schiró, C. Caronna, ..., A. Cupane: THE "PROTEIN DYNAMICAL TRANSITION" DOES NOT REQUIRE THE PROTEIN POLYPEPTIDE CHAIN. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2**, 2275–2279 (2011) [siehe S. 14].
- ¹⁸⁰ U. Lehnert, V. Réat, ..., C. Pfister: THERMAL MOTIONS IN BACTERIORHODOPSIN AT DIFFERENT HYDRATION LEVELS STUDIED BY NEUTRON SCATTERING: CORRELATION WITH KINETICS AND LIGHT-INDUCED CONFORMATIONAL CHANGES. In: *Biophysical Journal* **75**, 1945–1952 (1998) [siehe S. 14].
- ¹⁸¹ H. Lichtenegger, W. Doster, ..., G. Vogl: HEME–SOLVENT COUPLING: A MÖSSBAUER STUDY OF MYOGLOBIN IN SUCROSE. In: *Biophysical Journal* **76**, 414–422 (1999) [siehe S. 14].
- ¹⁸² R. M. Daniel, J. C. Smith, ..., J. L. Finney: ENZYME ACTIVITY BELOW THE DYNAMICAL TRANSITION AT 220 K. In: *Biophysical Journal* **75**, 2504–2507 (1998) [siehe S. 14].
- ¹⁸³ J. M. Braggar, R. V. Dunn, R. M. Daniel: ENZYME ACTIVITY DOWN TO -100°C . In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1480**, 278–282 (2000) [siehe S. 14].
- ¹⁸⁴ R. V. Dunn, V. Réat, ..., R. M. Daniel: ENZYME ACTIVITY AND DYNAMICS: XYLANASE ACTIVITY IN THE ABSENCE OF FAST ANHARMONIC DYNAMICS. In: *Biochemical Journal* **346**, 355–358 (2000) [siehe S. 14].
- ¹⁸⁵ R. D. Young, H. Frauenfelder, P. W. Fenimore: MÖSSBAUER EFFECT IN PROTEINS. In: *Physical Review Letters* **107**, 158102 (2011) [siehe S. 15].
- ¹⁸⁶ F.-X. Gallat, A. Laganowsky, ..., M. Weik: DYNAMICAL COUPLING OF INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS AND THEIR HYDRATION WATER: COMPARISON WITH FOLDED SOLUBLE AND MEMBRANE PROTEINS. In: *Biophysical Journal* **103**, 129–136 (2012) [siehe S. 15, 94, 108, 159].
- ¹⁸⁷ S. Bone, R. Pethig: DIELECTRIC STUDIES OF THE BINDING OF WATER TO LYSOZYME. In: *Journal of Molecular Biology* **157**, 571–575 (1982) [siehe S. 15, 111].
- ¹⁸⁸ R. H. Austin, D. L. Stein, J. Wang: TERBIUM LUMINESCENCE-LIFETIME HETEROGENEITY AND PROTEIN EQUILIBRIUM CONFORMATIONAL DYNAMICS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 1541–1545 (1987) [siehe S. 15].
- ¹⁸⁹ M. Diehl, W. Doster, ..., H. Schober: WATER-COUPLED LOW-FREQUENCY MODES OF MYOGLOBIN AND LYSOZYME OBSERVED BY INELASTIC NEUTRON SCATTERING. In: *Biophysical Journal* **73**, 2726–2732 (1997) [siehe S. 15].
- ¹⁹⁰ W. Doster, M. Settles: PROTEIN–WATER DISPLACEMENT DISTRIBUTIONS. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1749**, 173–186 (2005) [siehe S. 15, 159].
- ¹⁹¹ Y. Matveev: THE PLASTICIZING EFFECT OF WATER ON PROTEINS, POLYSACCHARIDES AND THEIR MIXTURES. GLASSY STATE OF BIOPOLYMERS, FOOD AND SEEDS. In: *Food Hydrocolloids* **14**, 425–437 (2000) [siehe S. 15].
- ¹⁹² W. Doster: THE TWO-STEP SCENARIO OF THE PROTEIN DYNAMICAL TRANSITION. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **357**, 622–628 (2011) [siehe S. 15, 70, 74, 83, 86].
- ¹⁹³ K. L. Ngai, S. Capaccioli, A. Paciaroni: NATURE OF THE WATER SPECIFIC RELAXATION IN HYDRATED PROTEINS AND AQUEOUS MIXTURES. In: *Chemical Physics* **424**, 37–44 (2013) [siehe S. 16].
- ¹⁹⁴ S.-H. Chen, L. Liu, ..., E. Mamontov: OBSERVATION OF FRAGILE-TO-STRONG DYNAMIC Crossover IN PROTEIN HYDRATION WATER. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9012–9016 (2006) [siehe S. 16, 80, 83, 160].
- ¹⁹⁵ P. H. Poole, F. Sciortino, ..., H. E. Stanley: PHASE BEHAVIOUR OF METASTABLE WATER. In: *Nature* **360**, 324–328 (1992) [siehe S. 16, 160].
- ¹⁹⁶ L. Xu, P. Kumar, ..., H. E. Stanley: RELATION BETWEEN THE WIDOM LINE AND THE DYNAMIC Crossover IN SYSTEMS WITH A LIQUID-LIQUID PHASE TRANSITION. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 16558–16562 (2005) [siehe S. 16, 160].

- ¹⁹⁷ F. Mallamace, M. Broccio, ..., S.H. Chen: THE FRAGILE-TO-STRONG DYNAMIC Crossover TRANSITION IN CONFINED WATER: NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE RESULTS. In: *The Journal of Chemical Physics* **124**, 161102 (2006) [siehe S. 16, 136].
- ¹⁹⁸ G. Schiró, M. Fomina, A. Cupane: COMMUNICATION: PROTEIN DYNAMICAL TRANSITION VS. LIQUID-LIQUID PHASE TRANSITION IN PROTEIN HYDRATION WATER. In: *The Journal of Chemical Physics* **139**, 121102 (2013) [siehe S. 16, 136].
- ¹⁹⁹ G. Camisasca, M. D. Marzio, ..., P. Gallo: TWO STRUCTURAL RELAXATIONS IN PROTEIN HYDRATION WATER AND THEIR DYNAMIC CROSOVERS. In: *The Journal of Chemical Physics* **145**, 044503 (2016) [siehe S. 16, 136].
- ²⁰⁰ S.A. Lusceac, M. Vogel: ²H NMR STUDY OF THE WATER DYNAMICS IN HYDRATED MYOGLOBIN. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 10209–10216 (2010) [siehe S. 16, 70, 80, 100, 134, 136, 137, 157, 158, 160].
- ²⁰¹ M. Rosenstihl, M. Vogel: STATIC AND PULSED FIELD GRADIENT NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDIES OF WATER DIFFUSION IN PROTEIN MATRICES. In: *The Journal of Chemical Physics* **135**, 164503 (2011) [siehe S. 16, 83, 136, 160].
- ²⁰² K. Gekko, S.N. Timasheff: MECHANISM OF PROTEIN STABILIZATION BY GLYCEROL: PREFERENTIAL HYDRATION IN GLYCEROL-WATER MIXTURES. In: *Biochemistry* **20**, 4667–4676 (1981) [siehe S. 17, 65].
- ²⁰³ J. F. Carpenter, J. H. Crowe: THE MECHANISM OF CRYOPROTECTION OF PROTEINS BY SOLUTES. In: *Cryobiology* **25**, 244–255 (1988) [siehe S. 17].
- ²⁰⁴ P.H. Schummel, M. Gao, R. Winter: MODULATION OF THE POLYMERIZATION KINETICS OF α/β -TUBULIN BY OSMOLYTES AND MACROMOLECULAR CROWDING. In: *ChemPhysChem* **18**, 189–197 (2016) [siehe S. 17].
- ²⁰⁵ J.-M. Knop, R. Winter: EFFECTS OF COSOLVENTS AND MACROMOLECULAR CROWDING ON THE PHASE TRANSITIONS AND TEMPERATURE-PRESSURE STABILITY OF CHIRAL AND RACEMIC POLY-LYSINE. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **232**, 1111–1125 (2018) [siehe S. 17].
- ²⁰⁶ K. Schmidt-Rohr, H. W. Spiess: MULTIDIMENSIONAL SOLID-STATE NMR AND POLYMERS. 1. Aufl. London (1994) [siehe S. 18, 26, 40, 47].
- ²⁰⁷ F. Kremer, A. Schönhals, Hrsg.: BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY. Berlin (2003) [siehe S. 18, 56–58, 117, 123, 124].
- ²⁰⁸ M. Bée: QUASIELASTIC NEUTRON SCATTERING. Bristol (1988) [siehe S. 19, 47, 76, 78].
- ²⁰⁹ R. Kubo: THE FLUCTUATION-DISSIPATION THEOREM. In: *Reports on Progress in Physics* **29**, 255–284 (1966) [siehe S. 19].
- ²¹⁰ S. Havriliak, S. Negami: A COMPLEX PLANE ANALYSIS OF α -DISPERSIONS IN SOME POLYMER SYSTEMS. In: *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* **14**, 99–117 (1966) [siehe S. 20].
- ²¹¹ K. S. Cole, R. H. Cole: DISPERSION AND ABSORPTION IN DIELECTRICS I. ALTERNATING CURRENT CHARACTERISTICS. In: *The Journal of Chemical Physics* **9**, 341–351 (1941) [siehe S. 20].
- ²¹² D. W. Davidson, R. H. Cole: DIELECTRIC RELAXATION IN GLYCEROL, PROPYLENE GLYCOL, AND N-PROPANOL. In: *The Journal of Chemical Physics* **19**, 1484–1490 (1951) [siehe S. 21, 171].
- ²¹³ R. Hilfer: H-FUNCTION REPRESENTATIONS FOR STRETCHED EXPONENTIAL RELAXATION AND NON-DEBYE SUSCEPTIBILITIES IN GLASSY SYSTEMS. In: *Physical Review E* **65**. (2002) [siehe S. 21, 172].
- ²¹⁴ G. Mittag-Leffler: SUR LA NOUVELLE FONCTION $E_a(x)$. In: *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. (1903) [siehe S. 21].
- ²¹⁵ M. Wolf, S. Emmert, ..., A. Loidl: DYNAMICS OF PROTEIN HYDRATION WATER. In: *Physical Review E* **92**. (2015) [siehe S. 21, 126].

- ²¹⁶ G. R. Kneller, K. Hinsen: FRACTIONAL BROWNIAN DYNAMICS IN PROTEINS. In: *The Journal of Chemical Physics* **121**, 10278–10283 (2004) [siehe S. 21].
- ²¹⁷ T. Neusius, I. Daidone, . . . , J. C. Smith: SUBDIFFUSION IN PEPTIDES ORIGINATES FROM THE FRACTAL-LIKE STRUCTURE OF CONFIGURATION SPACE. In: *Physical Review Letters* **100**. (2008) [siehe S. 21].
- ²¹⁸ W. G. Glöckle, T. F. Nonnenmacher: A FRACTIONAL CALCULUS APPROACH TO SELF-SIMILAR PROTEIN DYNAMICS. In: *Biophysical Journal* **68**, 46–53 (1995) [siehe S. 22, 123].
- ²¹⁹ G. R. Kneller: QUASIELASTIC NEUTRON SCATTERING AND RELAXATION PROCESSES IN PROTEINS: ANALYTICAL AND SIMULATION-BASED MODELS. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **7**, 2641 (2005) [siehe S. 22, 123].
- ²²⁰ C. Gainaru, O. Lips, . . . , E. A. Rössler: ON THE NATURE OF THE HIGH-FREQUENCY RELAXATION IN A MOLECULAR GLASS FORMER: A JOINT STUDY OF GLYCEROL BY FIELD CYCLING NMR, DIELECTRIC SPECTROSCOPY, AND LIGHT SCATTERING. In: *The Journal of Chemical Physics* **128**, 174505 (2008) [siehe S. 22, 65, 111].
- ²²¹ C. P. Lindsey, G. D. Patterson: DETAILED COMPARISON OF THE WILLIAMS–WATTS AND COLE–DAVIDSON FUNCTIONS. In: *The Journal of Chemical Physics* **73**, 3348–3357 (1980) [siehe S. 22, 23].
- ²²² M. Vogel, C. Brinkmann, . . . , A. Heuer: SILVER DYNAMICS IN SILVER IODIDE/SILVER PHOSPHATE GLASSES STUDIED BY MULTI-DIMENSIONAL ¹⁰⁹Ag NMR. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **4**, 3237–3245 (2002) [siehe S. 23].
- ²²³ T. Bauer, M. Köhler, . . . , C. A. Angell: RELAXATION DYNAMICS AND IONIC CONDUCTIVITY IN A FRAGILE PLASTIC CRYSTAL. In: *The Journal of Chemical Physics* **133**, 144509 (2010) [siehe S. 23].
- ²²⁴ R. Zorn: LOGARITHMIC MOMENTS OF RELAXATION TIME DISTRIBUTIONS. In: *The Journal of Chemical Physics* **116**, 3204–3209 (2002) [siehe S. 23].
- ²²⁵ R. Díaz-Calleja: COMMENT ON THE MAXIMUM IN THE LOSS PERMITTIVITY FOR THE HAVRI-LIAK–NEGAMI EQUATION. In: *Macromolecules* **33**, 8924–8924 (2000) [siehe S. 25].
- ²²⁶ C. P. Slichter: PRINCIPLES OF MAGNETIC RESONANCE. (1978) [siehe S. 26].
- ²²⁷ M. J. Duer: SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY PRINCIPLES AND APPLICATIONS. (2007) [siehe S. 26].
- ²²⁸ R. Kimmich: NMR - TOMOGRAPHY, DIFFUSOMETRY, RELAXOMETRY. (1996) [siehe S. 28].
- ²²⁹ S. A. Smith, W. E. Palke, J. T. Gerig: THE HAMILTONIANS OF NMR. PART I. In: *Concepts in Magnetic Resonance* **4**, 107–144 (1992) [siehe S. 28].
- ²³⁰ R. K. Harris, E. D. Becker, . . . , K. W. Zilm: FURTHER CONVENTIONS FOR NMR SHIELDING AND CHEMICAL SHIFTS (IUPAC RECOMMENDATIONS 2008). In: *Pure and Applied Chemistry* **80**, 59–84 (2008) [siehe S. 31].
- ²³¹ M. H. Levitt: SPIN DYNAMICS – BASICS OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE. Chichester (2005) [siehe S. 32].
- ²³² E. Fukushima, S. B. W. Roeder: EXPERIMENTAL PULSE NMR: A NUTS AND BOLTS APPROACH. 7. Aufl. Reading (1996) [siehe S. 33].
- ²³³ H. W. Spiess, H. Sillescu: SOLID ECHOES IN THE SLOW-MOTION REGION. In: *Journal of Magnetic Resonance* (1969) **42**, 381–389 (1981) [siehe S. 34, 144].
- ²³⁴ N. Bloembergen, E. M. Purcell, R. V. Pound: RELAXATION EFFECTS IN NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE ABSORPTION. In: *Physical Review* **73**, 679–712 (1948) [siehe S. 34].
- ²³⁵ B. Geil, G. Hinze: INFLUENCE OF DATA TREATMENT ON THE SHAPE OF ²H NMR T₁ CURVES. In: *Chemical Physics Letters* **216**, 51–55 (1993) [siehe S. 35].
- ²³⁶ M. Vogel, E. Rössler: SLOW PROCESS IN SIMPLE ORGANIC GLASS FORMERS STUDIED BY ONE- AND TWO-DIMENSIONAL ²H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE. I. In: *The Journal of Chemical Physics* **114**, 5802–5815 (2001) [siehe S. 37, 65].

- ²³⁷ E. Rössler, M. Taupitz, ..., H.-M. Vieth: A SIMPLE METHOD ANALYZING ^2H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE LINE SHAPES TO DETERMINE THE ACTIVATION ENERGY DISTRIBUTION OF MOBILE GUEST MOLECULES IN DISORDERED SYSTEMS. In: *The Journal of Chemical Physics* **92**, 5847–5855 (1990) [siehe S. 38, 39, 141].
- ²³⁸ M. Vogel, T. Torbrügge: ION AND POLYMER DYNAMICS IN POLYMER ELECTROLYTES PPO-LiClO₄. I. INSIGHTS FROM NMR LINE-SHAPE ANALYSIS. In: *The Journal of Chemical Physics* **125**, 054905 (2006) [siehe S. 38].
- ²³⁹ S. Schildmann: AUFLÄRUNG DER MOLEKULAREN DYNAMIK IN GLASBILDENDEN MONOALKOHOLEN MITHILFE DER KERNSPINRESONANZ-SPEKTROSKOPIE. Dissertation, Technische Universität Dortmund (2012) [siehe S. 38].
- ²⁴⁰ M. Sattig, S. Reutter, ..., M. Vogel: NMR STUDIES ON THE TEMPERATURE-DEPENDENT DYNAMICS OF CONFINED WATER. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **16**, 19229–19240 (2014) [siehe S. 38, 80, 86, 95, 105, 134, 135, 158, 173].
- ²⁴¹ J. Jeener, P. Broekaert: NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE IN SOLIDS: THERMODYNAMIC EFFECTS OF A PAIR OF RF PULSES. In: *Physical Review* **157**, 232–240 (1967) [siehe S. 39].
- ²⁴² H. W. Spiess: DEUTERON SPIN ALIGNMENT: A PROBE FOR STUDYING ULTRASLOW MOTIONS IN SOLIDS AND SOLID POLYMERS. In: *The Journal of Chemical Physics* **72**, 6755–6762 (1980) [siehe S. 40].
- ²⁴³ D. Schaefer, J. Leisen, H. W. Spiess: EXPERIMENTAL ASPECTS OF MULTIDIMENSIONAL EXCHANGE SOLID-STATE NMR. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **115**, 60–79 (1995) [siehe S. 40, 184].
- ²⁴⁴ F. Fujara, W. Petry, ..., H. Sillescu: REORIENTATION OF BENZENE IN ITS CRYSTALLINE STATE: A MODEL CASE FOR THE ANALOGY BETWEEN NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPIN ALIGNMENT AND QUASIELASTIC INCOHERENT NEUTRON SCATTERING. In: *The Journal of Chemical Physics* **89**, 1801–1806 (1988) [siehe S. 40].
- ²⁴⁵ B. Geil, F. Fujara, H. Sillescu: ^2H NMR TIME DOMAIN ANALYSIS OF ULTRASLOW REORIENTATIONS IN SUPERCOOLED LIQUIDS. In: *Journal of Magnetic Resonance* **130**, 18–26 (1998) [siehe S. 40].
- ²⁴⁶ A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh: PROTON-ENHANCED NMR OF DILUTE SPINS IN SOLIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **59**, 569–590 (1973) [siehe S. 41].
- ²⁴⁷ R. B. Gregory, M. Gangoda, ..., W. Su: THE INFLUENCE OF HYDRATION ON THE CONFORMATION OF LYSOZYME STUDIED BY SOLID-STATE ^{13}C -NMR SPECTROSCOPY. In: *Biopolymers* **33**, 513–519 (1993) [siehe S. 42, 90, 151, 155].
- ²⁴⁸ A. Perry, M. P. Stypa, ..., K. K. Kumashiro: SOLID-STATE ^{13}C NMR REVEALS EFFECTS OF TEMPERATURE AND HYDRATION ON ELASTIN. In: *Biophysical Journal* **82**, 1086–1095 (2002) [siehe S. 42, 87, 88].
- ²⁴⁹ D. Huster, L. Naji, ..., K. Arnold: DYNAMICS OF THE BIOPOLYMERS IN ARTICULAR CARTILAGE STUDIED BY MAGIC ANGLE SPINNING NMR. In: *Applied Magnetic Resonance* **27**, 471–487 (2004) [siehe S. 42].
- ²⁵⁰ V. Chevelkov, U. Fink, B. Reif: QUANTITATIVE ANALYSIS OF BACKBONE MOTION IN PROTEINS USING MAS SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY. In: *Journal of Biomolecular NMR* **45**, 197–206 (2009) [siehe S. 42].
- ²⁵¹ A. B. Siemer, K.-Y. Huang, A. E. McDermott: PROTEIN LINEWIDTH AND SOLVENT DYNAMICS IN FROZEN SOLUTION NMR. In: *PLoS ONE* **7**, e47242 (2012) [siehe S. 42].
- ²⁵² S. R. Hartmann, E. L. Hahn: NUCLEAR DOUBLE RESONANCE IN THE ROTATING FRAME. In: *Physical Review* **128**, 2042–2053 (1962) [siehe S. 43].
- ²⁵³ S. Hediger, B. H. Meier, R. R. Ernst: CROSS POLARIZATION UNDER FAST MAGIC ANGLE SAMPLE SPINNING USING AMPLITUDE-MODULATED SPIN-LOCK SEQUENCES. In: *Chemical Physics Letters* **213**, 627–635 (1993) [siehe S. 43].

- ²⁵⁴ G. Metz, X.L. Wu, S.O. Smith: RAMPED-AMPLITUDE CROSS POLARIZATION IN MAGIC-ANGLE-SPINNING NMR. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **110**, 219–227 (1994) [siehe S. 44].
- ²⁵⁵ O.B. Peersen, X.L. Wu, ..., S.O. Smith: VARIABLE-AMPLITUDE CROSS-POLARIZATION MAS NMR. In: *Journal of Magnetic Resonance Series A* **104**, 334–339 (1993) [siehe S. 44].
- ²⁵⁶ S. Hediger, B.H. Meier, ..., R.R. Ernst: NMR CROSS POLARIZATION BY ADIABATIC PASSAGE THROUGH THE HARTMANN–HAHN CONDITION (APHH). In: *Chemical Physics Letters* **223**, 283–288 (1994) [siehe S. 44].
- ²⁵⁷ W. Gabrielse, H.A. Gaur, ..., W.S. Veeman: ¹³C SOLID-STATE NMR STUDY OF DIFFERENTLY PROCESSED POLY(ETHYLENE TEREPHTHALATE) YARNS. In: *Macromolecules* **27**, 5811–5820 (1994) [siehe S. 44].
- ²⁵⁸ M.F. Cobo, K. Maliňáková, ..., E.R. deAzevedo: INTERMEDIATE MOTIONS AND DIPOLAR COUPLINGS AS STUDIED BY LEE–GOLDBURG CROSS-POLARIZATION NMR: HARTMANN–HAHN MATCHING PROFILES. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 7036 (2009) [siehe S. 45, 89, 151].
- ²⁵⁹ E.R. deAzevedo, K. Saalwächter, ..., D. Reichert: INTERMEDIATE MOTIONS AS STUDIED BY SOLID-STATE SEPARATED LOCAL FIELD NMR EXPERIMENTS. In: *The Journal of Chemical Physics* **128**, 104505 (2008) [siehe S. 45].
- ²⁶⁰ E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades: NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTRA FROM A CRYSTAL ROTATED AT HIGH SPEED. In: *Nature* **182**, 1659–1659 (1958) [siehe S. 45].
- ²⁶¹ I.J. Lowe: FREE INDUCTION DECAYS OF ROTATING SOLIDS. In: *Physical Review Letters* **2**, 285–287 (1959) [siehe S. 45].
- ²⁶² D. Reichert, G. Hempel, ..., Z. Luz: DYNAMIC CARBON-13 MAS NMR: APPLICATION TO BENZENE RING FLIPS IN POLYARYL ETHERS. In: *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **18**, 17–36 (2000) [siehe S. 46].
- ²⁶³ P. Schanda, M. Ernst: STUDYING DYNAMICS BY MAGIC-ANGLE SPINNING SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS TO BIOMOLECULES. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **96**, 1–46 (2016) [siehe S. 46].
- ²⁶⁴ A.E. Bennett, C.M. Rienstra, ..., R.G. Griffin: HETERONUCLEAR DECOUPLING IN ROTATING SOLIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **103**, 6951–6958 (1995) [siehe S. 46].
- ²⁶⁵ B.M. Fung, A.K. Khitrin, K. Ermolaev: AN IMPROVED BROADBAND DECOUPLING SEQUENCE FOR LIQUID CRYSTALS AND SOLIDS. In: *Journal of Magnetic Resonance* **142**, 97–101 (2000) [siehe S. 46].
- ²⁶⁶ A. Detken, E.H. Hardy, ..., B.H. Meier: SIMPLE AND EFFICIENT DECOUPLING IN MAGIC-ANGLE SPINNING SOLID-STATE NMR: THE XiX SCHEME. In: *Chemical Physics Letters* **356**, 298–304 (2002) [siehe S. 46].
- ²⁶⁷ M. Edén, M.H. Levitt: PULSE SEQUENCE SYMMETRIES IN THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE OF SPINNING SOLIDS: APPLICATION TO HETERONUCLEAR DECOUPLING. In: *The Journal of Chemical Physics* **111**, 1511–1519 (1999) [siehe S. 46].
- ²⁶⁸ J.M. Vinther, A.B. Nielsen, ..., N.C. Nielsen: REFOCUSED CONTINUOUS-WAVE DECOUPLING: A NEW APPROACH TO HETERONUCLEAR DIPOLE DECOUPLING IN SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY. In: *The Journal of Chemical Physics* **137**, 214202 (2012) [siehe S. 46].
- ²⁶⁹ R.R. Ernst: NUCLEAR MAGNETIC DOUBLE RESONANCE WITH AN INCOHERENT RADIO-FREQUENCY FIELD. In: *The Journal of Chemical Physics* **45**, 3845–3861 (1966) [siehe S. 46].
- ²⁷⁰ W.P. Rothwell, J.S. Waugh: TRANSVERSE RELAXATION OF DIPOLAR COUPLED SPIN SYSTEMS UNDER RF IRRADIATION: DETECTING MOTIONS IN SOLIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **74**, 2721–2732 (1981) [siehe S. 47].
- ²⁷¹ T. Miyoshi, K. Takegoshi, K. Hikichi: HIGH-RESOLUTION SOLID STATE ¹³C NMR STUDY OF THE INTERPOLYMER INTERACTION, MORPHOLOGY AND CHAIN DYNAMICS OF THE POLY(ACRYLIC ACID)/POLY(ETHYLENE OXIDE)

- COMPLEX. In: *Polymer* **38**, 2315–2320 (1997) [siehe S. 47].
- ²⁷² V.F. Sears: NEUTRON SCATTERING LENGTHS AND CROSS SECTIONS. In: *Neutron News* **3**, 26–37 (1992) [siehe S. 49].
- ²⁷³ T. Blochowicz, E. Gouirand, ..., B. Frick: ACCELERATED DYNAMICS OF SUPERCOOLED GLYCEROL IN SOFT CONFINEMENT. In: *Chemical Physics Letters* **475**, 171–174 (2009) [siehe S. 49].
- ²⁷⁴ W. Doster, H. Nakagawa, M. S. Appavou: SCALING ANALYSIS OF BIO-MOLECULAR DYNAMICS DERIVED FROM ELASTIC INCOHERENT NEUTRON SCATTERING EXPERIMENTS. In: *The Journal of Chemical Physics* **139**, 045105 (2013) [siehe S. 49, 69, 85, 157].
- ²⁷⁵ J. D. Nickels, H. O'Neill, ..., A. P. Sokolov: DYNAMICS OF PROTEIN AND ITS HYDRATION WATER: NEUTRON SCATTERING STUDIES ON FULLY DEUTERATED GFP. In: *Biophysical Journal* **103**, 1566–1575 (2012) [siehe S. 49, 121].
- ²⁷⁶ Z. Yi, Y. Miao, ..., J. C. Smith: DERIVATION OF MEAN-SQUARE DISPLACEMENTS FOR PROTEIN DYNAMICS FROM ELASTIC INCOHERENT NEUTRON SCATTERING. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 5028–5036 (2012) [siehe S. 52].
- ²⁷⁷ W. Doster, M. Diehl, ..., M. Ferrand: ELASTIC RESOLUTION SPECTROSCOPY: A METHOD TO STUDY MOLECULAR MOTIONS IN SMALL BIOLOGICAL SAMPLES. In: *Physica B: Condensed Matter* **301**, 65–68 (2001) [siehe S. 53].
- ²⁷⁸ F. Gabel: PROTEIN DYNAMICS IN SOLUTION AND POWDER MEASURED BY INCOHERENT ELASTIC NEUTRON SCATTERING: THE INFLUENCE OF Q-RANGE AND ENERGY RESOLUTION. In: *European Biophysics Journal* **34**, 1–12 (2005) [siehe S. 53].
- ²⁷⁹ G. Zaccai: HOW SOFT IS A PROTEIN? A PROTEIN DYNAMICS FORCE CONSTANT MEASURED BY NEUTRON SCATTERING. In: *Science* **288**, 1604–1607 (2000) [siehe S. 53].
- ²⁸⁰ H.-H. Grapengeter, B. Alefeld, R. Kosfeld: AN INVESTIGATION OF MICRO-BROWNIAN MOTIONS IN POLYDIMETHYLSILOXANE BY COMPLEMENTARY INCOHERENT-NEUTRON-SCATTERING AND NUCLEAR-MAGNETIC-RESONANCE EXPERIMENTS BELOW ROOM TEMPERATURE. In: *Colloid and Polymer Science* **265**, 226–233 (1987) [siehe S. 53, 75, 76, 148].
- ²⁸¹ B. Frick, J. Combet, L. van Eijck: NEW POSSIBILITIES WITH INELASTIC FIXED WINDOW SCANS AND LINEAR MOTOR DOPPLER DRIVES ON HIGH RESOLUTION NEUTRON BACKSCATTERING SPECTROMETERS. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **669**, 7–13 (2012) [siehe S. 54, 76, 78].
- ²⁸² H. Jansson, R. Bergman, J. Swenson: RELATION BETWEEN SOLVENT AND PROTEIN DYNAMICS AS STUDIED BY DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 24134–24141 (2005) [siehe S. 55, 104].
- ²⁸³ S. Roy, R. Richert: DIELECTRIC SPECTROSCOPY STUDY OF MYOGLOBIN IN GLYCEROL–WATER MIXTURES. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1844**, 323–329 (2014) [siehe S. 55, 59, 121, 123, 153, 156].
- ²⁸⁴ J. G. Kirkwood: THE DIELECTRIC POLARIZATION OF POLAR LIQUIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **7**, 911–919 (1939) [siehe S. 55].
- ²⁸⁵ M. Samet, V. Levchenko, ..., A. Serghei: ELECTRODE POLARIZATION VS. MAXWELL–WAGNER–SILLARS INTERFACIAL POLARIZATION IN DIELECTRIC SPECTRA OF MATERIALS: CHARACTERISTIC FREQUENCIES AND SCALING LAWS. In: *The Journal of Chemical Physics* **142**, 194703 (2015) [siehe S. 56, 124].
- ²⁸⁶ P. A. M. Steeman, J. van Turnhout: FINE STRUCTURE IN THE PARAMETERS OF DIELECTRIC AND VISCOELASTIC RELAXATIONS. In: *Macromolecules* **27**, 5421–5427 (1994) [siehe S. 58].

- 287 M. Wübbenhorst, J. van Turnhout: ANALYSIS OF COMPLEX DIELECTRIC SPECTRA. I. ONE-DIMENSIONAL DERIVATIVE TECHNIQUES AND THREE-DIMENSIONAL MODELLING. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **305**, 40–49 (2002) [siehe S. 58].
- 288 P.B. Ishai, M. S. Talary, . . . , Y. Feldman: ELECTRODE POLARIZATION IN DIELECTRIC MEASUREMENTS: A REVIEW. In: *Measurement Science and Technology* **24**, 102001 (2013) [siehe S. 59].
- 289 C. Chassagne, E. Dubois, . . . , J. van Turnhout: COMPENSATING FOR ELECTRODE POLARIZATION IN DIELECTRIC SPECTROSCOPY STUDIES OF COLLOIDAL SUSPENSIONS: THEORETICAL ASSESSMENT OF EXISTING METHODS. In: *Frontiers in Chemistry* **4**. (2016) [siehe S. 59].
- 290 C. Gainaru, R. Böhmer, G. Williams: ION SWEEPING IN CONDUCTING DIELECTRIC MATERIALS. In: *The European Physical Journal B* **75**, 209–216 (2010) [siehe S. 59].
- 291 C. Gainaru, A. Fillmer, R. Böhmer: DIELECTRIC RESPONSE OF DEEPLY SUPERCOOLED HYDRATION WATER IN THE CONNECTIVE TISSUE PROTEINS COLLAGEN AND ELASTIN. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 12628–12631 (2009) [siehe S. 59, 87, 114, 122, 129, 134, 135, 157].
- 292 H. Jansson, R. Bergman, J. Swenson: HIDDEN SLOW DYNAMICS IN WATER. In: *Physical Review Letters* **104**. (2010) [siehe S. 59].
- 293 R. Richert: COMMENT ON “HIDDEN SLOW DYNAMICS IN WATER”. In: *Physical Review Letters* **104**. (2010) [siehe S. 59].
- 294 C. P. Gainaru, R. Böhmer: COMMENT ON “HIDDEN SLOW DYNAMICS IN WATER”. In: *Physical Review Letters* **104**. (2010) [siehe S. 59].
- 295 P.B. Ishai, Z. Sobol, . . . , A. P. Sokolov: AN ASSESSMENT OF COMPARATIVE METHODS FOR APPROACHING ELECTRODE POLARIZATION IN DIELECTRIC PERMITTIVITY MEASUREMENTS. In: *Review of Scientific Instruments* **83**, 083118 (2012) [siehe S. 59].
- 296 L. Debelle, A. M. Tamburro: ELASTIN: MOLECULAR DESCRIPTION AND FUNCTION. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **31**, 261–272 (1999) [siehe S. 63].
- 297 L. D. Muiznieks, A. S. Weiss, F.W. Keeley: STRUCTURAL DISORDER AND DYNAMICS OF ELASTIN. In: *Biochemistry and Cell Biology* **88**, 239–250 (2010) [siehe S. 63].
- 298 W. R. GRAY, L. B. SANDBERG, J. A. FOSTER: MOLECULAR MODEL FOR ELASTIN STRUCTURE AND FUNCTION. In: *Nature* **246**, 461–466 (1973) [siehe S. 63].
- 299 C. A. J. Hoeve, P.J. Flory: THE ELASTIC PROPERTIES OF ELASTIN. In: *Biopolymers* **13**, 677–686 (1974) [siehe S. 63, 89].
- 300 H. Reiersen, A. R. Clarke, A. R. Rees: SHORT ELASTIN-LIKE PEPTIDES EXHIBIT THE SAME TEMPERATURE-INDUCED STRUCTURAL TRANSITIONS AS ELASTIN POLYMERS: IMPLICATIONS FOR PROTEIN ENGINEERING. In: *Journal of Molecular Biology* **283**, 255–264 (1998) [siehe S. 63, 89].
- 301 B. Li, D. O. V. Alonso, . . . , V. Daggett: HYDROPHOBIC HYDRATION IS AN IMPORTANT SOURCE OF ELASTICITY IN ELASTIN-BASED BIOPOLYMERS. In: *Journal of the American Chemical Society* **123**, 11991–11998 (2001) [siehe S. 63, 89].
- 302 D. W. Urry, T. Hugel, . . . , T. Parker: ELASTIN: A REPRESENTATIVE IDEAL PROTEIN ELASTOMER. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **357**, 169–184 (2002) [siehe S. 63, 89].
- 303 C. Nicolini, R. Ravindra, . . . , R. Winter: CHARACTERIZATION OF THE TEMPERATURE- AND PRESSURE-INDUCED INVERSE AND REENTRANT TRANSITION OF THE MINIMUM ELASTIN-LIKE POLYPEPTIDE GVG(VPGVG) BY DSC, PPC, CD, AND FT-IR SPECTROSCOPY. In: *Biophysical Journal* **86**, 1385–1392 (2004) [siehe S. 63].
- 304 K. K. Kumashiro, K. Ohgo, . . . , T. Asakura: STRUCTURAL INSIGHTS INTO THE ELASTIN MIMETIC (LGGVG)₆ USING SOLID-STATE ¹³C NMR EXPERIMENTS AND STATISTICAL ANALYSIS OF THE PDB. In: *Biopolymers* **89**, 668–679 (2008) [siehe S. 63].

- ³⁰⁵ M. Vogel: TEMPERATURE-DEPENDENT MECHANISMS FOR THE DYNAMICS OF PROTEIN-HYDRATION WATERS: A MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 9386–9392 (2009) [siehe S. 63, 94, 104, 134].
- ³⁰⁶ S. Weißheit, M. Kahse, ..., C.M. Thiele: ELASTIN-LIKE PEPTIDE IN CONFINEMENT: FT-IR AND NMR T_1 RELAXATION DATA. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **232**, 1239–1261 (2018) [siehe S. 63].
- ³⁰⁷ A. Fleming: ON A REMARKABLE BACTERIOLYTIC ELEMENT FOUND IN TISSUES AND SECRETIONS. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **93**, 306–317 (1922) [siehe S. 63].
- ³⁰⁸ S.A. Ragland, A.K. Criss: FROM BACTERIAL KILLING TO IMMUNE MODULATION: RECENT INSIGHTS INTO THE FUNCTIONS OF LYSOZYME. In: *PLOS Pathogens* **13**, e1006512 (2017) [siehe S. 63].
- ³⁰⁹ P. Jollès, J. Jollès: WHAT'S NEW IN LYSOZYME RESEARCH? In: *Mol. Cell. Biochem.* **63**, 165–189 (1984) [siehe S. 63].
- ³¹⁰ J.E. Lovelock: HET MECHANISM OF THE PROTECTIVE ACTION OF GLYCEROL AGAINST HAE-MOLYSIS BY FREEZING AND THAWING. In: *Biochimica et Biophysica Acta* **11**, 28–36 (1953) [siehe S. 63].
- ³¹¹ D.B. Pribor: BIOLOGICAL INTERACTIONS BETWEEN CELL MEMBRANES AND GLYCEROL OR DM-SO. In: *Cryobiology* **12**, 309–320 (1975) [siehe S. 63].
- ³¹² W.C. Röntgen: UEBER DIE CONSTITUTION DES FLÜSSIGEN WASSERS. In: *Annalen der Physik und Chemie* **281**, 91–97 (1892) [siehe S. 64].
- ³¹³ C.A. Angell: SUPERCOOLED WATER. In: *Annual Review of Physical Chemistry* **34**, 593–630 (1983) [siehe S. 64].
- ³¹⁴ P.G. Debenedetti: SUPERCOOLED AND GLASSY WATER. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **15**, R1669–R1726 (2003) [siehe S. 64].
- ³¹⁵ B. Guillot: A REAPPRAISAL OF WHAT WE HAVE LEARNED DURING THREE DECADES OF COMPUTER SIMULATIONS ON WATER. In: *Journal of Molecular Liquids* **101**, 219–260 (2002) [siehe S. 64].
- ³¹⁶ O. Mishima, H.E. Stanley: THE RELATIONSHIP BETWEEN LIQUID, SUPERCOOLED AND GLASSY WATER. In: *Nature* **396**, 329–335 (1998) [siehe S. 64].
- ³¹⁷ S. Cervený, F. Mallamace, ..., L. Xu: CONFINED WATER AS MODEL OF SUPERCOOLED WATER. In: *Chemical Reviews* **116**, 7608–7625 (2016) [siehe S. 64, 162].
- ³¹⁸ J. Wuttke, W. Petry, ..., F. Fujara: FAST DYNAMICS OF GLASS-FORMING GLYCEROL. In: *Physical Review E* **52**, 4026–4034 (1995) [siehe S. 65, 74].
- ³¹⁹ D. Kruk, R. Meier, E.A. Rössler: TRANSLATIONAL AND ROTATIONAL DIFFUSION OF GLYCEROL BY MEANS OF FIELD CYCLING 1H NMR RELAXOMETRY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 951–957 (2011) [siehe S. 65].
- ³²⁰ D. Beece, L. Eisenstein, ..., K.T. Yue: SOLVENT VISCOSITY AND PROTEIN DYNAMICS. In: *Biochemistry* **19**, 5147–5157 (1980) [siehe S. 65, 87].
- ³²¹ G. Caliskan, D. Mechtani, ..., I. Peral: PROTEIN AND SOLVENT DYNAMICS: HOW STRONGLY ARE THEY COUPLED? In: *The Journal of Chemical Physics* **121**, 1978–1983 (2004) [siehe S. 65, 87, 157].
- ³²² A. Inaba, O. Andersson: MULTIPLE GLASS TRANSITIONS AND TWO STEP CRYSTALLIZATION FOR THE BINARY SYSTEM OF WATER AND GLYCEROL. In: *Thermochimica Acta* **461**, 44–49 (2007) [siehe S. 65].
- ³²³ I. Popov, A. Greenbaum (Gutina), ..., Y. Feldman: THE PUZZLING FIRST-ORDER PHASE TRANSITION IN WATER-GLYCEROL MIXTURES. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 18063–18071 (2015) [siehe S. 65, 95].
- ³²⁴ M.H. Jensen, C. Gainaru, ..., K. Niss: SLOW RHEOLOGICAL MODE IN GLYCEROL AND GLYCEROL-WATER MIXTURES. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**, 1716–1723 (2018) [siehe S. 65].
- ³²⁵ J.A. Trejo González, M.P. Longinotti, H.R. Corti: THE VISCOSITY OF GLYCEROL-WATER MIXTURES INCLUDING THE SUPERCOOLED REGION. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* **56**, 1397–1406 (2011) [siehe S. 65].

- ³²⁶ A. Puzenko, Y. Hayashi, ..., R. Behrends: RELAXATION DYNAMICS IN GLYCEROL–WATER MIXTURES: I. GLYCEROL-RICH MIXTURES. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 6031–6035 (2005) [siehe S. 65, 104].
- ³²⁷ Y. Hayashi, A. Puzenko, ..., Y. Feldman: RELAXATION DYNAMICS IN GLYCEROL–WATER MIXTURES. 2. MESOSCOPIC FEATURE IN WATER RICH MIXTURES. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 9174–9177 (2005) [siehe S. 65].
- ³²⁸ R. Sinibaldi, M.G. Ortore, ..., P. Mariani: PREFERENTIAL HYDRATION OF LYSOZYME IN WATER/GLYCEROL MIXTURES: A SMALL-ANGLE NEUTRON SCATTERING STUDY. In: *The Journal of Chemical Physics* **126**, 235101 (2007) [siehe S. 65].
- ³²⁹ S. Sanwlan, P. Kumar, H.B. Bohidar: HYDRATION OF GELATIN MOLECULES IN GLYCEROL–WATER SOLVENT AND PHASE DIAGRAM OF GELATIN ORGANOGELS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 7332–7340 (2011) [siehe S. 65].
- ³³⁰ O. Ronsin, C. Caroli, T. Baumberger: PREFERENTIAL HYDRATION FULLY CONTROLS THE RENATURATION DYNAMICS OF COLLAGEN IN WATER–GLYCEROL SOLVENTS. In: *The European Physical Journal E* **40**. (2017) [siehe S. 65].
- ³³¹ A. Bonincontro, V. Calandrini, G. Onori: ROTATIONAL AND TRANSLATIONAL DYNAMICS OF LYSOZYME IN WATER–GLYCEROL SOLUTION. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **21**, 311–316 (2001) [siehe S. 65].
- ³³² J. Xu, Y. Xue, N. R. Skrynnikov: DETECTION OF NANOSECOND TIME SCALE SIDE-CHAIN JUMPS IN A PROTEIN DISSOLVED IN WATER/GLYCEROL SOLVENT. In: *Journal of Biomolecular NMR* **45**, 57–72 (2009) [siehe S. 65].
- ³³³ H. Jansson, F. Kargl, ..., J. Swenson: DYNAMICS OF A PROTEIN AND ITS SURROUNDING ENVIRONMENT: A QUASIELASTIC NEUTRON SCATTERING STUDY OF MYOGLOBIN IN WATER AND GLYCEROL MIXTURES. In: *The Journal of Chemical Physics* **130**, 205101 (2009) [siehe S. 65, 110, 115].
- ³³⁴ P.K. GhattyVenkataKrishna, G.A. Carri: EFFECT OF GLYCEROL–WATER BINARY MIXTURES ON THE STRUCTURE AND DYNAMICS OF PROTEIN SOLUTIONS. In: *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **32**, 424–437 (2013) [siehe S. 65].
- ³³⁵ D.H. Rasmussen, A.P. MacKenzie: PHASE DIAGRAM FOR THE SYSTEM WATER–DIMETHYLSULPHOXIDE. In: *Nature* **220**, 1315–1317 (1968) [siehe S. 65].
- ³³⁶ J. Catalán, C. Díaz, F. García-Blanco: CHARACTERIZATION OF BINARY SOLVENT MIXTURES OF DMSO WITH WATER AND OTHER COSOLVENTS. In: *The Journal of Organic Chemistry* **66**, 5846–5852 (2001) [siehe S. 65].
- ³³⁷ R. L. Mancera, M. Chalaris, ..., J. Samios: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF DILUTE AQUEOUS DMSO SOLUTIONS. A TEMPERATURE-DEPENDENCE STUDY OF THE HYDROPHOBIC AND HYDROPHILIC BEHAVIOUR AROUND DMSO. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 94 (2004) [siehe S. 65].
- ³³⁸ S.A. Lusceac, C. Gainaru, ..., M. Vogel: SECONDARY WATER RELAXATION IN A WATER-/DIMETHYL SULFOXIDE MIXTURE REVEALED BY DEUTERON NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE AND DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 11588–11596 (2011) [siehe S. 65, 110, 119, 128, 133, 135].
- ³³⁹ A. Luzar, J. Stefan: DIELECTRIC BEHAVIOUR OF DMSO–WATER MIXTURES. A HYDROGEN-BONDING MODEL. In: *Journal of Molecular Liquids* **46**, 221–238 (1990) [siehe S. 65, 120].
- ³⁴⁰ D.B. Wong, K.P. Sokolowsky, ..., M.D. Fayer: WATER DYNAMICS IN WATER/DMSO BINARY MIXTURES. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 5479–5490 (2012) [siehe S. 65].
- ³⁴¹ I. Płowaś, J. Świergiel, J. Jadzyn: RELATIVE STATIC PERMITTIVITY OF DIMETHYL SULFOXIDE + WATER MIXTURES. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* **58**, 1741–1746 (2013) [siehe S. 65, 120].

- ³⁴² D. P. Geerke, C. Oostenbrink, ..., W. F. van Gunsteren: AN EFFECTIVE FORCE FIELD FOR MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF DIMETHYL SULFOXIDE AND DIMETHYL SULFOXIDE–WATER MIXTURES. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 1436–1445 (2004) [siehe S. 65].
- ³⁴³ M. M. Palaiologou, G. K. Arianas, N. G. Tsierkezos: THERMODYNAMIC INVESTIGATION OF DIMETHYL SULFOXIDE BINARY MIXTURES AT 293.15 AND 313.15 K. In: *Journal of Solution Chemistry* **35**, 1551–1565 (2006) [siehe S. 65].
- ³⁴⁴ M. Jackson, H. H. Mantsch: BEWARE OF PROTEINS IN DMSO. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1078**, 231–235 (1991) [siehe S. 65, 120].
- ³⁴⁵ E. P. G. Arêas, J. A. G. Arêas, ..., P. S. Santos: ON THE HIGH VISCOSITY OF AQUEOUS SOLUTION OF LYSOZYME INDUCED BY SOME ORGANIC SOLVENTS. In: *Journal of Colloid and Interface Science* **180**, 578–589 (1996) [siehe S. 65].
- ³⁴⁶ I. K. Voets, W. A. Cruz, ..., P. Schurtenberger: DMSO-INDUCED DENATURATION OF HEN EGG WHITE LYSOZYME. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 11875–11883 (2010) [siehe S. 65, 109, 120, 152].
- ³⁴⁷ R. Ghosh, S. Banerjee, ..., B. Bagchi: SENSITIVITY OF POLARIZATION FLUCTUATIONS TO THE NATURE OF PROTEIN–WATER INTERACTIONS: STUDY OF BIOLOGICAL WATER IN FOUR DIFFERENT PROTEIN–WATER SYSTEMS. In: *The Journal of Chemical Physics* **141**, 22D531 (2014) [siehe S. 65, 121].
- ³⁴⁸ H. Jóhannesson, V. P. Denisov, B. Halle: DIMETHYL SULFOXIDE BINDING TO GLOBULAR PROTEINS: A NUCLEAR MAGNETIC RELAXATION DISPERSION STUDY. In: *Protein Science* **6**, 1756–1763 (1997) [siehe S. 65].
- ³⁴⁹ S. Ghosh, S. Chattoraj, ..., K. Bhattacharya: STRUCTURE AND DYNAMICS OF LYSOZYME IN DMSO–WATER BINARY MIXTURE: FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY. In: *RSC Advances* **4**, 14378 (2014) [siehe S. 65].
- ³⁵⁰ D. K. Das, A. Patra, R. K. Mitra: PREFERENTIAL SOLVATION OF LYSOZYME IN DIMETHYL SULFOXIDE/WATER BINARY MIXTURE PROBED BY TERAHERTZ SPECTROSCOPY. In: *Biophysical Chemistry* **216**, 31–36 (2016) [siehe S. 65].
- ³⁵¹ P. Allen, F. Creuzet, ..., R. Griffin: APPARATUS FOR LOW-TEMPERATURE MAGIC-ANGLE SPINNING NMR. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **92**, 614–617 (1991) [siehe S. 67].
- ³⁵² K. R. Thurber, R. Tycko: MEASUREMENT OF SAMPLE TEMPERATURES UNDER MAGIC-ANGLE SPINNING FROM THE CHEMICAL SHIFT AND SPIN-LATTICE RELAXATION RATE OF ^{79}Br IN KBr POWDER. In: *Journal of Magnetic Resonance* **196**, 84–87 (2009) [siehe S. 67].
- ³⁵³ C. P. Grey, A. K. Cheetham, C. M. Dobson: TEMPERATURE-DEPENDENT SOLID-STATE ^{119}Sn MAS NMR OF $\text{Nd}_2\text{Sn}_2\text{O}_7$, $\text{Sm}_2\text{Sn}_2\text{O}_7$, AND $\text{Y}_{1.8}\text{Sm}_{0.2}\text{Sn}_2\text{O}_7$. THREE SENSITIVE CHEMICAL-SHIFT THERMOMETERS. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **101**, 299–306 (1993) [siehe S. 67].
- ³⁵⁴ A. Bielecki, D. P. Burum: TEMPERATURE DEPENDENCE OF ^{207}Pb MAS SPECTRA OF SOLID LEAD NITRATE. AN ACCURATE, SENSITIVE THERMOMETER FOR VARIABLE-TEMPERATURE MAS. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **116**, 215–220 (1995) [siehe S. 67].
- ³⁵⁵ G. M. Bernard, A. Goyal, ..., V. K. Michaelis: METHYLAMMONIUM LEAD CHLORIDE: A SENSITIVE SAMPLE FOR AN ACCURATE NMR THERMOMETER. In: *Journal of Magnetic Resonance* **283**, 14–21 (2017) [siehe S. 67].
- ³⁵⁶ P. A. Beckmann, C. Dybowski: A THERMOMETER FOR NONSPINNING SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY. In: *Journal of Magnetic Resonance* **146**, 379–380 (2000) [siehe S. 67].
- ³⁵⁷ T. Takahashi, H. Kawashima, ..., T. Baba: ^{207}Pb CHEMICAL SHIFT THERMOMETER AT HIGH TEMPERATURE FOR MAGIC ANGLE SPINNING EXPERIMENTS. In: *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **15**, 119–123 (1999) [siehe S. 67, 68].

- ³⁵⁸ A. Gädke, C. Schmitt, ..., N. Nestle: DAMARIS – A FLEXIBLE AND OPEN SOFTWARE PLATFORM FOR NMR SPECTROMETER CONTROL. In: *Magnetic Resonance Imaging* **25**, 576 (2007) [siehe S. 68, 164].
- ³⁵⁹ R. Wipf, S. Jaksch, B. Stühn: DYNAMICS IN WATER–AOT–N-DECANE MICROEMULSIONS WITH POLY(ETHYLENE GLYCOL) PROBED BY DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *Colloid and Polymer Science* **288**, 589–601 (2010) [siehe S. 68].
- ³⁶⁰ J. Wuttke, A. Budwig, ..., S. Staringer: SPHERES, JÜLICH'S HIGH-FLUX NEUTRON BACKSCATTERING SPECTROMETER AT FRM II. In: *Review of Scientific Instruments* **83**, 075109 (2012) [siehe S. 69].
- ³⁶¹ J. H. Roh, V. N. Novikov, ..., A. P. Sokolov: ONSETS OF ANHARMONICITY IN PROTEIN DYNAMICS. In: *Physical Review Letters* **95**, (2005) [siehe S. 70, 72, 77, 138].
- ³⁶² A. Panagopoulou, A. Kyritsis, ..., P. Pissis: DYNAMICS OF UNCRYSTALLIZED WATER AND PROTEIN IN HYDRATED ELASTIN STUDIED BY THERMAL AND DIELECTRIC TECHNIQUES. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1834**, 977–988 (2013) [siehe S. 70, 71, 81, 90].
- ³⁶³ R. Zorn: MULTIPLE SCATTERING CORRECTION OF NEUTRON SCATTERING ELASTIC SCANS. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **572**, 874–881 (2007) [siehe S. 71, 72].
- ³⁶⁴ M. T. F. Telling, S. Howells, ..., V. García Sakai: MEAN SQUARED DISPLACEMENT ANALYSIS OF AN-HARMONIC BEHAVIOUR IN LYOPHILISED PROTEINS. In: *Chemical Physics* **424**, 32–36 (2013) [siehe S. 72].
- ³⁶⁵ S. Combet, J.-M. Zanotti: FURTHER EVIDENCE THAT INTERFACIAL WATER IS THE MAIN 'DRIVING FORCE' OF PROTEIN DYNAMICS: A NEUTRON SCATTERING STUDY ON PERDEUTERATED C-PHYCOCYANIN. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**, 4927 (2012) [siehe S. 72].
- ³⁶⁶ O. Debus, H. Zimmermann, ..., H. Sillescu: COMPARATIVE STUDY OF THE DEBYE–WALLER FACTOR ANOMALY AT THE GLASS TRANSITION OF ISOTOPICALLY SUBSTITUTED ORTHOTERPHENYLS. In: *Chemical Physics Letters* **180**, 271–274 (1991) [siehe S. 74].
- ³⁶⁷ C. Branca, S. Magazù, ..., F. Migliardo: VIBRATIONAL AND RELAXATIONAL CONTRIBUTIONS IN DISACCHARIDE/H₂O GLASS FORMERS. In: *Physical Review B* **64**, 224204 (2001) [siehe S. 74].
- ³⁶⁸ C. Gainaru, A. L. Agapov, ..., A. P. Sokolov: ANOMALOUSLY LARGE ISOTOPE EFFECT IN THE GLASS TRANSITION OF WATER. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 17402–17407 (2014) [siehe S. 74].
- ³⁶⁹ M. T. Cicerone, C. L. Soles: FAST DYNAMICS AND STABILIZATION OF PROTEINS: BINARY GLASSES OF TREHALOSE AND GLYCEROL. In: *Biophysical Journal* **86**, 3836–3845 (2004) [siehe S. 74].
- ³⁷⁰ K. K. Qian, P. J. Grobelny, ..., M. T. Cicerone: USING THE FLUORESCENCE RED EDGE EFFECT TO ASSESS THE LONG-TERM STABILITY OF LYOPHILIZED PROTEIN FORMULATIONS. In: *Molecular Pharmaceutics* **12**, 1141–1149 (2015) [siehe S. 74].
- ³⁷¹ M. Appel, B. Frick, ..., B. Stühn: MOLECULAR RING ROTATION IN SOLID FERROCENE REVISITED. In: *The Journal of Chemical Physics* **142**, 114503 (2015) [siehe S. 75].
- ³⁷² H. W. Hansen, B. Frick, ..., K. Niss: CONNECTION BETWEEN FRAGILITY, MEAN-SQUARED DISPLACEMENT, AND SHEAR MODULUS IN TWO VAN DER WAALS BONDED GLASS-FORMING LIQUIDS. In: *Physical Review B* **95**, 104202 (2017) [siehe S. 75].
- ³⁷³ K. Beshah, E. T. Olejniczak, R. G. Griffin: DEUTERIUM NMR STUDY OF METHYL GROUP DYNAMICS IN L-ALANINE. In: *The Journal of Chemical Physics* **86**, 4730–4736 (1987) [siehe S. 76, 148].

- ³⁷⁴ M. Tarek, D. J. Tobias: THE DYNAMICS OF PROTEIN HYDRATION WATER: A QUANTITATIVE COMPARISON OF MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS AND NEUTRON-SCATTERING EXPERIMENTS. In: *Biophysical Journal* **79**, 3244–3257 (2000) [siehe S. 79].
- ³⁷⁵ S. Cervený, Á. Alegria, J. Colmenero: UNIVERSAL FEATURES OF WATER DYNAMICS IN SOLUTIONS OF HYDROPHILIC POLYMERS, BIOPOLYMERS, AND SMALL GLASS-FORMING MATERIALS. In: *Physical Review E* **77**, 031803 (2008) [siehe S. 79, 80, 134–136].
- ³⁷⁶ A. Triolo, O. Russina, ..., H. Grimm: RELAXATION PROCESSES IN ROOM TEMPERATURE IONIC LIQUIDS: THE CASE OF 1-BUTYL-3-METHYL IMIDAZOLIUM HEXAFLUOROPHOSPHATE. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 22061–22066 (2005) [siehe S. 79].
- ³⁷⁷ J. Jöstström, J. Swenson, ..., S. Kittaka: INVESTIGATING HYDRATION DEPENDENCE OF DYNAMICS OF CONFINED WATER: MONOLAYER, HYDRATION WATER AND MAXWELL–WAGNER PROCESSES. In: *The Journal of Chemical Physics* **128**, 154503 (2008) [siehe S. 80, 134–137].
- ³⁷⁸ L. P. Singh, S. Cervený, ..., J. Colmenero: DYNAMICS OF WATER IN SUPERCOOLED AQUEOUS SOLUTIONS OF POLY(PROPYLENE GLYCOL) AS STUDIED BY BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY AND LOW-TEMPERATURE FTIR-ATR SPECTROSCOPY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 13817–13827 (2011) [siehe S. 80].
- ³⁷⁹ F. Mallamace, C. Corsaro, ..., S.-H. Chen: THE DYNAMICAL Crossover PHENOMENON IN BULK WATER, CONFINED WATER AND PROTEIN HYDRATION WATER. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **24**, 064103 (2012) [siehe S. 80].
- ³⁸⁰ S. Cervený, I. Combarro-Palacios, J. Swenson: EVIDENCE OF COUPLING BETWEEN THE MOTIONS OF WATER AND PEPTIDES. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters* **7**, 4093–4098 (2016) [siehe S. 82, 134–136, 153, 157].
- ³⁸¹ I. Combarro Palacios, C. Olsson, ..., S. Cervený: MOTIONS OF WATER AND SOLUTIONS—SLAVING VERSUS PLASTICIZATION PHENOMENA. In: *The Journal of Chemical Physics* **150**, 124902 (2019) [siehe S. 83, 159].
- ³⁸² R. D. Young, P. W. Fenimore: COUPLING OF PROTEIN AND ENVIRONMENT FLUCTUATIONS. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1814**, 916–921 (2011) [siehe S. 84, 159].
- ³⁸³ G. Caliskan, R. M. Briber, ..., A. P. Sokolov: DYNAMIC TRANSITION IN tRNA IS SOLVENT INDUCED. In: *Journal of the American Chemical Society* **128**, 32–33 (2006) [siehe S. 85].
- ³⁸⁴ A. Panagopoulou, A. Kyritsis, ..., P. Pissis: PROTEIN AND WATER DYNAMICS IN BOVINE SERUM ALBUMIN–WATER MIXTURES OVER WIDE RANGES OF COMPOSITION. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 4593–4602 (2012) [siehe S. 85].
- ³⁸⁵ S. Capaccioli, K. L. Ngai: RESOLVING THE CONTROVERSY ON THE GLASS TRANSITION TEMPERATURE OF WATER? In: *The Journal of Chemical Physics* **135**, 104504 (2011) [siehe S. 84].
- ³⁸⁶ J. Swenson, H. Jansson, R. Bergman: RELAXATION PROCESSES IN SUPERCOOLED CONFINED WATER AND IMPLICATIONS FOR PROTEIN DYNAMICS. In: *Physical Review Letters* **96**, (2006) [siehe S. 84, 121].
- ³⁸⁷ K. Elamin, H. Jansson, ..., J. Swenson: DIFFERENT BEHAVIOR OF WATER IN CONFINED SOLUTIONS OF HIGH AND LOW SOLUTE CONCENTRATIONS. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 18437 (2013) [siehe S. 84].
- ³⁸⁸ M. Roussanova, M. A. Alam, ..., F. Kleitz: A NANO-SCALE FREE VOLUME PERSPECTIVE ON THE GLASS TRANSITION OF SUPERCOOLED WATER IN CONFINEMENT. In: *New Journal of Physics* **16**, 103030 (2014) [siehe S. 86, 158].
- ³⁸⁹ P. Maheshwari, D. Dutta, ..., P. K. Pujari: POSITRON ANNIHILATION AND NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDY OF THE PHASE BEHAVIOR OF WATER CONFINED IN MESOPORES AT DIFFERENT LEVELS OF HYDRATION. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 12886–12895 (2016) [siehe S. 86, 158].
- ³⁹⁰ S. Capaccioli, K. L. Ngai, N. Shinyashiki: THE JOHARI–GOLDSTEIN β -RELAXATION OF WATER. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 8197–8209 (2007) [siehe S. 86].

- ³⁹¹ T. Blochowicz, S.A. Lusceac, ..., B. Stühn: TWO GLASS TRANSITIONS AND SECONDARY RELAXATIONS OF METHYLTETRAHYDROFURAN IN A BINARY MIXTURE. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 1623–1637 (2011) [siehe S. 86].
- ³⁹² J. E. G. Lipson, S. T. Milner: MULTIPLE GLASS TRANSITIONS AND LOCAL COMPOSITION EFFECTS ON POLYMER SOLVENT MIXTURES. In: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **44**, 3528–3545 (2006) [siehe S. 86].
- ³⁹³ E. Mamontov, H. O'Neill: MICROSCOPIC RELAXATIONS IN A PROTEIN SUSTAINED DOWN TO 160 K IN A NON-GLASS FORMING ORGANIC SOLVENT. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1861**, 3513–3519 (2017) [siehe S. 86].
- ³⁹⁴ E. Mamontov, V.K. Sharma, ..., M. Tyagi: PROTEIN-STYLE DYNAMICAL TRANSITION IN A NON-BIOLOGICAL POLYMER AND A NON-AQUEOUS SOLVENT. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **120**, 3232–3239 (2016) [siehe S. 86].
- ³⁹⁵ G.E. Ellis, K.J. Packer: NUCLEAR SPIN-RELAXATION STUDIES OF HYDRATED ELASTIN. In: *Biopolymers* **15**, 813–832 (1976) [siehe S. 87].
- ³⁹⁶ A. Papaioannou, M. Louis, ..., G.S. Boutis: QUANTITATIVE COMPARISON OF STRUCTURE AND DYNAMICS OF ELASTIN FOLLOWING THREE ISOLATION SCHEMES BY ¹³C SOLID STATE NMR AND MALDI MASS SPECTROMETRY. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1854**, 391–401 (2015) [siehe S. 87].
- ³⁹⁷ M. Matti Maricq, J.S. Waugh: NMR IN ROTATING SOLIDS. In: *The Journal of Chemical Physics* **70**, 3300–3316 (1979) [siehe S. 88].
- ³⁹⁸ X.L. Yao, V.P. Conticello, M. Hong: INVESTIGATION OF THE DYNAMICS OF AN ELASTIN-MIMETIC POLYPEPTIDE USING SOLID-STATE NMR. In: *Magnetic Resonance in Chemistry* **42**, 267–275 (2004) [siehe S. 89].
- ³⁹⁹ F. Jofre, M.E. Anderson, J.L. Markley: *BioMagResBank: Glycerol* [siehe S. 89].
- ⁴⁰⁰ J.A. Padró, L. Saiz, E. Guàrdia: HYDROGEN BONDING IN LIQUID ALCOHOLS: A COMPUTER SIMULATION STUDY. In: *Journal of Molecular Structure* **416**, 243–248 (1997) [siehe S. 89].
- ⁴⁰¹ S. Bone: TIME-DOMAIN REFLECTOMETRY STUDIES OF WATER BINDING AND STRUCTURAL FLEXIBILITY IN CHYMOTRYPSIN. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **916**, 128–134 (1987) [siehe S. 90].
- ⁴⁰² S.D. Kennedy, R.G. Bryant: STRUCTURAL EFFECTS OF HYDRATION: STUDIES OF LYSOZYME BY ¹³C SOLIDS NMR. In: *Biopolymers* **29**, 1801–1806 (1990) [siehe S. 90, 151, 155].
- ⁴⁰³ D. Malzacher: ¹³C-NMR-PROTEINDYNAMIK VON MYOGLOBIN UND ELASTIN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2013) [siehe S. 91].
- ⁴⁰⁴ N. Haase: TEMPERATURABHÄNGIGE ¹³C-NMR-UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINDYNAMIK VON ELASTIN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2013) [siehe S. 91].
- ⁴⁰⁵ T. Wohlfromm, M. Vogel: ON THE COUPLING OF PROTEIN AND WATER DYNAMICS IN CONFINEMENT: SPATIALLY RESOLVED MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDIES. In: *The Journal of Chemical Physics* **150**, 245101 (2019) [siehe S. 94, 104].
- ⁴⁰⁶ W. Koshekhan: ²H-NMR-UNTERSUCHUNG DER GLYCERINDYNAMIK VON WASSER–GLYCERINMISCHUNG IN ELASTINMATRIZEN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2016) [siehe S. 94].
- ⁴⁰⁷ M. Reuhl: CHARAKTERISIERUNG DER DYNAMIK VON ETHYLENGLYKOL IN HARTEM CONFINEMENT DURCH NMR-MESSUNGEN UND DIELEKTRISCHE SPEKTROSKOPIE. Master-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2017) [siehe S. 95].
- ⁴⁰⁸ D. Demuth, M. Sattig, ..., M. Vogel: ²H NMR STUDIES ON THE DYNAMICS OF PURE AND MIXED HYDROGEN-BONDED LIQUIDS IN CONFINEMENT. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **232**, 1059–1087 (2018) [siehe S. 95, 97, 103].

- ⁴⁰⁹ M. Weigler, M. Brodrecht, ..., M. Vogel: RE-ORIENTATION OF DEEPLY COOLED WATER IN MESOPOROUS SILICA: NMR STUDIES OF THE PORE-SIZE DEPENDENCE. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **123**, 2123–2134 (2019) [siehe S. 95, 105, 106, 132].
- ⁴¹⁰ M. Vogel, E. Rössler: EFFECTS OF VARIOUS TYPES OF MOLECULAR DYNAMICS ON 1D AND 2D ²H NMR STUDIED BY RANDOM WALK SIMULATIONS. In: *Journal of Magnetic Resonance* **147**, 43–58 (2000) [siehe S. 102].
- ⁴¹¹ V. Samouillan, A. Lamure, C. Lacabanne: DIELECTRIC RELAXATIONS OF COLLAGEN AND ELASTIN IN THE DEHYDRATED STATE. In: *Chemical Physics* **255**, 259–271 (2000) [siehe S. 104, 105].
- ⁴¹² S. Pawlus, S. Khodadadi, A. P. Sokolov: CONDUCTIVITY IN HYDRATED PROTEINS: NO SIGNS OF THE FRAGILE-TO-STRONG CROSSOVER. In: *Physical Review Letters* **100**. (2008) [siehe S. 104].
- ⁴¹³ H. Jansson, R. Bergman, J. Swenson: ROLE OF SOLVENT FOR THE DYNAMICS AND THE GLASS TRANSITION OF PROTEINS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 4099–4109 (2011) [siehe S. 104, 123, 153, 156].
- ⁴¹⁴ M. Weigler. UNERÖFFENTLICHTE MESSDATEN. (2019) [siehe S. 104].
- ⁴¹⁵ M. Reuhl. UNVERÖFFENTLICHTE MESSDATEN. (2019) [siehe S. 104].
- ⁴¹⁶ D. F. Sauer: DEUTERONEN-NMR-UNTERSUCHUNGEN DER DYNAMIK VON GLYCERIN IN PROTEINMATRIZEN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2010) [siehe S. 104, 105].
- ⁴¹⁷ M. Lannert, A. Müller, ..., M. Vogel: GLYCEROL IN MICELLAR CONFINEMENT WITH TUNABLE RIGIDITY. In: *The Journal of Chemical Physics* **145**, 234511 (2016) [siehe S. 105].
- ⁴¹⁸ L. Yang, J. S. Dordick, S. Garde: HYDRATION OF ENZYME IN NONAQUEOUS MEDIA IS CONSISTENT WITH SOLVENT DEPENDENCE OF ITS ACTIVITY. In: *Biophysical Journal* **87**, 812–821 (2004) [siehe S. 105].
- ⁴¹⁹ Y. Miyazaki, T. Matsuo, H. Suga: LOW-TEMPERATURE HEAT CAPACITY AND GLASSY BEHAVIOR OF LYSOZYME CRYSTAL. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **104**, 8044–8052 (2000) [siehe S. 109, 110].
- ⁴²⁰ M. Hopfenmüller: UNTERSUCHUNG DER LÖSUNGSMITTELDYNAMIK VON DMSO-WASSER MISCHUNGEN IN LYSOZYM. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2016) [siehe S. 109].
- ⁴²¹ S. Schoner: NMR-UNTERSUCHUNGEN AN DMSO-WASSER-MISCHUNGEN IN LYSOZYM-MATRIZEN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2016) [siehe S. 109].
- ⁴²² C. Lederle, M. Sattig, M. Vogel: EFFECTS OF PARTIAL CRYSTALLIZATION ON THE DYNAMICS OF WATER IN MESOPOROUS SILICA. In: *The Journal of Physical Chemistry C* **122**, 15427–15434 (2018) [siehe S. 109].
- ⁴²³ A. Mohs, S. Decker, J. Gmehling: THE SOLID–LIQUID EQUILIBRIUM OF THE BINARY SYSTEM H₂O–DMSO AND THE INFLUENCE OF A SALT (NaCl, KCl) ON THE THERMODYNAMIC BEHAVIOR. In: *Fluid Phase Equilibria* **304**, 12–20 (2011) [siehe S. 111].
- ⁴²⁴ A. Bonincontro, A. D. Francesco, G. Onori: TEMPERATURE-INDUCED CONFORMATIONAL CHANGES OF NATIVE LYSOZYME IN AQUEOUS SOLUTION STUDIED BY DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *Chemical Physics Letters* **301**, 189–192 (1999) [siehe S. 113].
- ⁴²⁵ M. Nakanishi, P. Griffin, ..., A. P. Sokolov: NO FRAGILE-TO-STRONG CROSSOVER IN LiCl–H₂O SOLUTION. In: *The Journal of Chemical Physics* **136**, 124512 (2012) [siehe S. 114].
- ⁴²⁶ L. A. Dissado, R. M. Hill: ANOMALOUS LOW-FREQUENCY DISPERSION. NEAR DIRECT CURRENT CONDUCTIVITY IN DISORDERED LOW-DIMENSIONAL MATERIALS. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* **80**, 291 (1984) [siehe S. 115].
- ⁴²⁷ G. Careri, M. Geraci, ..., J. A. Rupley: PROTONIC CONDUCTIVITY OF HYDRATED LYSOZYME POWDERS AT MEGAHERTZ FREQUENCIES. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 5342–5346 (1985) [siehe S. 115].

- ⁴²⁸ P. M. Suherman, P. Taylor, G. Smith: LOW FREQUENCY DIELECTRIC STUDY ON HYDRATED OV-ALBUMIN. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **305**, 317–321 (2002) [siehe S. 115].
- ⁴²⁹ Y. J. P. Carreón, H. Mercado-Urbe: DIELECTRIC SPECTROSCOPY OF BIOMOLECULES AT LOW FREQUENCIES: EVIDENCE OF PROTON WIRES. In: *Journal of Molecular Liquids* **223**, 136–140 (2016) [siehe S. 115].
- ⁴³⁰ R. Bergman, J. Swenson, ..., P. Jacobsson: DIELECTRIC STUDY OF SUPERCOOLED 2D WATER IN A VERMICULITE CLAY. In: *The Journal of Chemical Physics* **113**, 357–363 (2000) [siehe S. 115, 136].
- ⁴³¹ J. Swenson, S. Cervený: DYNAMICS OF DEEPLY SUPERCOOLED INTERFACIAL WATER. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **27**, 033102 (2014) [siehe S. 115].
- ⁴³² A. K. Jonscher: LOW-FREQUENCY DISPERSION IN CARRIER-DOMINATED DIELECTRICS. In: *Philosophical Magazine B* **38**, 587–601 (1978) [siehe S. 117].
- ⁴³³ Y. Feldman, R. Nigmatullin, ..., J. Texter: FRACTAL-POLARIZATION CORRECTION IN TIME DOMAIN DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *Physical Review E* **58**, 7561–7565 (1998) [siehe S. 117].
- ⁴³⁴ F. Bordi, C. Cametti, T. Gili: REDUCTION OF THE CONTRIBUTION OF ELECTRODE POLARIZATION EFFECTS IN THE RADIOWAVE DIELECTRIC MEASUREMENTS OF HIGHLY CONDUCTIVE BIOLOGICAL CELL SUSPENSIONS. In: *Bioelectrochemistry* **54**, 53–61 (2001) [siehe S. 117].
- ⁴³⁵ J. R. Macdonald: IMPEDANCE SPECTROSCOPY AND ITS USE IN ANALYZING THE STEADY-STATE AC RESPONSE OF SOLID AND LIQUID ELECTROLYTES. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **223**, 25–50 (1987) [siehe S. 117].
- ⁴³⁶ S. Emmert, M. Wolf, ..., A. Loidl: ELECTRODE POLARIZATION EFFECTS IN BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *The European Physical Journal B* **83**, 157–165 (2011) [siehe S. 118].
- ⁴³⁷ U. Kaatz, R. Pottel, M. Schaefer: DIELECTRIC SPECTRUM OF DIMETHYL SULFOXIDE/WATER MIXTURES AS A FUNCTION OF COMPOSITION. In: *The Journal of Physical Chemistry* **93**, 5623–5627 (1989) [siehe S. 120].
- ⁴³⁸ M. S. Skaf: MOLECULAR DYNAMICS STUDY OF DIELECTRIC PROPERTIES OF WATER–DIMETHYL SULFOXIDE MIXTURES. In: *The Journal of Physical Chemistry A* **103**, 10719–10729 (1999) [siehe S. 120].
- ⁴³⁹ R. Busselez, R. Lefort, ..., D. Morineau: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF NANOCONFINED GLYCEROL. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 11127 (2009) [siehe S. 121].
- ⁴⁴⁰ F. Klameth, M. Vogel: STRUCTURE AND DYNAMICS OF SUPERCOOLED WATER IN NEUTRAL CONFINEMENTS. In: *The Journal of Chemical Physics* **138**, 134503 (2013) [siehe S. 121].
- ⁴⁴¹ R. Schmitz, N. Müller, ..., M. Vogel: A MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS STUDY ON ETHYLENE GLYCOL–WATER MIXTURES IN MESOPOROUS SILICA. In: *The Journal of Chemical Physics* **145**, 104703 (2016) [siehe S. 121].
- ⁴⁴² F. Pizzitutti, F. Bruni: GLASSY DYNAMICS AND ENZYMIC ACTIVITY OF LYSOZYME. In: *Physical Review E* **64**, (2001) [siehe S. 122].
- ⁴⁴³ K. Mpoukouvalas, G. Floudas, G. Williams: ORIGIN OF THE α , β , ($\beta\alpha$), AND “SLOW” DIELECTRIC PROCESSES IN POLY(ETHYL METHACRYLATE). In: *Macromolecules* **42**, 4690–4700 (2009) [siehe S. 122].
- ⁴⁴⁴ R. Casalini, C. M. Roland: ON THE LOW FREQUENCY LOSS PEAK IN THE DIELECTRIC SPECTRUM OF GLYCEROL. In: *The Journal of Chemical Physics* **135**, 094502 (2011) [siehe S. 122].
- ⁴⁴⁵ R. Richert, A. Agapov, A. P. Sokolov: APPEARANCE OF A DEBYE PROCESS AT THE CONDUCTIVITY RELAXATION FREQUENCY OF A VISCOUS LIQUID. In: *The Journal of Chemical Physics* **134**, 104508 (2011) [siehe S. 122].
- ⁴⁴⁶ A. Oleinikova, N. Smolin, I. Brovchenko: INFLUENCE OF WATER CLUSTERING ON THE DYNAMICS OF HYDRATION WATER AT THE SURFACE OF A LYSOZYME. In: *Biophysical Journal* **93**, 2986–3000 (2007) [siehe S. 122].

- ⁴⁴⁷ S. Khodadadi, J. E. Curtis, A. P. Sokolov: NANO-SECOND RELAXATION DYNAMICS OF HYDRATED PROTEINS: WATER VERSUS PROTEIN CONTRIBUTIONS. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 6222–6226 (2011) [siehe S. 122].
- ⁴⁴⁸ V. Calandrini, D. Abergel, G. R. Kneller: FRACTIONAL PROTEIN DYNAMICS SEEN BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY: RELATING MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION AND EXPERIMENT. In: *The Journal of Chemical Physics* **133**, 145101 (2010) [siehe S. 123].
- ⁴⁴⁹ F. Pabst, J. Gabriel, ..., T. Blochowicz: MOLECULAR DYNAMICS OF SUPERCOOLED IONIC LIQUIDS STUDIED BY LIGHT SCATTERING AND DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *Chemical Physics* **494**, 103–110 (2017) [siehe S. 123].
- ⁴⁵⁰ F. Stickel, E. W. Fischer, R. Richert: DYNAMICS OF GLASS-FORMING LIQUIDS. II. DETAILED COMPARISON OF DIELECTRIC RELAXATION, DC-CONDUCTIVITY, AND VISCOSITY DATA. In: *The Journal of Chemical Physics* **104**, 2043–2055 (1996) [siehe S. 123].
- ⁴⁵¹ M. A. Ratner, D. F. Shriver: ION TRANSPORT IN SOLVENT-FREE POLYMERS. In: *Chemical Reviews* **88**, 109–124 (1988) [siehe S. 124].
- ⁴⁵² M. Vogel, T. Torbrügge: ION AND POLYMER DYNAMICS IN POLYMER ELECTROLYTES PPO–LiClO₄. II. ²H AND ⁷Li NMR STIMULATED-ECHO EXPERIMENTS. In: *The Journal of Chemical Physics* **125**, 164910 (2006) [siehe S. 124].
- ⁴⁵³ Z. Xue, D. He, X. Xie: POLY(ETHYLENE OXIDE)-BASED ELECTROLYTES FOR LITHIUM-ION BATTERIES. In: *Journal of Materials Chemistry A* **3**, 19218–19253 (2015) [siehe S. 124].
- ⁴⁵⁴ J. R. Macdonald: THEORY OF AC SPACE-CHARGE POLARIZATION EFFECTS IN PHOTOCONDUCTORS, SEMICONDUCTORS, AND ELECTROLYTES. In: *Physical Review* **92**, 4–17 (1953) [siehe S. 125].
- ⁴⁵⁵ R. J. Klein, S. Zhang, ..., J. Runt: MODELING ELECTRODE POLARIZATION IN DIELECTRIC SPECTROSCOPY: ION MOBILITY AND MOBILE ION CONCENTRATION OF SINGLE-ION POLYMER ELECTROLYTES. In: *The Journal of Chemical Physics* **124**, 144903 (2006) [siehe S. 125].
- ⁴⁵⁶ G. J. Tudryn, W. Liu, ..., R. H. Colby: COUNTERION DYNAMICS IN POLYESTER–SULFONATE IONOMERS WITH IONIC LIQUID COUNTERIONS. In: *Macromolecules* **44**, 3572–3582 (2011) [siehe S. 125, 177].
- ⁴⁵⁷ Wikipedia: The free encyclopedia: *Duck test*. (Besucht am 10. 07. 2018) [siehe S. 126].
- ⁴⁵⁸ N. Shinyashiki, W. Yamamoto, ..., S. Capaccioli: GLASS TRANSITIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS OF PROTEIN (BOVINE SERUM ALBUMIN). In: *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 14448–14456 (2009) [siehe S. 126].
- ⁴⁵⁹ K. Sasaki, A. Panagopoulou, ..., P. Pissis: DYNAMICS OF UNCRYSTALLIZED WATER, ICE, AND HYDRATED PROTEIN IN PARTIALLY CRYSTALLIZED GELATIN–WATER MIXTURES STUDIED BY BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **121**, 265–272 (2016) [siehe S. 126].
- ⁴⁶⁰ G. Haggis: PROTON-DEUTERON EXCHANGE IN PROTEIN AND NUCLEOPROTEIN MOLECULES SURROUNDED BY HEAVY WATER. In: *Biochimica et Biophysica Acta* **23**, 494–503 (1957) [siehe S. 127].
- ⁴⁶¹ D. Ratzke: ²H-NMR-UNTERSUCHUNGEN ZUR KRYOKONSERVIERUNG VON PROTEINEN IN H²O–C₂H₆SO-MISCHUNGEN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2008) [siehe S. 129, 130, 137].
- ⁴⁶² M. Graf: ²H-NMR-UNTERSUCHUNGEN AN WASSER-DIMETHYLSULFOXID-PROTEIN-MISCHUNGEN. Bachelor-Thesis, Technische Universität Darmstadt (2009) [siehe S. 129, 130, 137].
- ⁴⁶³ M. Rosenstihl, K. Kämpf, ..., M. Vogel: DYNAMICS OF INTERFACIAL WATER. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **407**, 449–458 (2015) [siehe S. 129].
- ⁴⁶⁴ B. Geil, G. Diezemann, R. Böhmer: CORRELATION OF PRIMARY RELAXATIONS AND HIGH-FREQUENCY MODES IN SUPERCOOLED LIQUIDS. I. THEORETICAL BACKGROUND OF A NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE EXPERIMENT. In: *Physical Review E* **74**, (2006) [siehe S. 132].

- ⁴⁶⁵ A. Nowaczyk, B. Geil, ..., R. Böhmer: CORRELATION OF PRIMARY RELAXATIONS AND HIGH-FREQUENCY MODES IN SUPERCOOLED LIQUIDS. II. EVIDENCE FROM SPIN-LATTICE RELAXATION WEIGHTED STIMULATED-ECHO SPECTROSCOPY. In: *Physical Review E* **74**. (2006) [siehe S. 132].
- ⁴⁶⁶ N. Karabas: NMR-UNTERSUCHUNGEN DER DYNAMIK WÄSSRIGER MISCHUNGEN IN UNTERSCHIEDLICHEN UMGEBUNGEN. Proposal, Technische Universität (2018) [siehe S. 133, 152].
- ⁴⁶⁷ J. E. Anderson: ENVIRONMENTAL FLUCTUATIONS AND ROTATIONAL PROCESSES IN LIQUIDS. In: *Faraday Symposia of the Chemical Society* **6**, 82 (1972) [siehe S. 133, 134].
- ⁴⁶⁸ G. Diezemann, R. Böhmer, ..., H. Sillescu: REORIENTATIONAL DYNAMICS IN SIMPLE SUPERCOOLED LIQUIDS. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* **235-237**, 121–127 (1998) [siehe S. 133, 134].
- ⁴⁶⁹ S. Schneider, M. Vogel: NMR STUDIES ON THE COUPLING OF ION AND WATER DYNAMICS ON VARIOUS TIME AND LENGTH SCALES IN GLASS-FORMING LiCl AQUEOUS SOLUTIONS. In: *The Journal of Chemical Physics* **149**, 104501 (2018) [siehe S. 134, 135].
- ⁴⁷⁰ J. Sjöström, J. Mattsson, ..., J. Swenson: DIELECTRIC SECONDARY RELAXATION OF WATER IN AQUEOUS BINARY GLASS-FORMERS. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 10452 (2010) [siehe S. 134, 135].
- ⁴⁷¹ T. Miyatou, T. Araya, ..., M. Mizuno: HYDRATION WATER DYNAMICS IN BOVINE SERUM ALBUMIN AT LOW TEMPERATURES AS STUDIED BY DEUTERIUM SOLID-STATE NMR. In: *Journal of Molecular Structure* **1121**, 80–85 (2016) [siehe S. 134].
- ⁴⁷² J. Swenson, H. Jansson, ..., R. Bergman: PROPERTIES OF HYDRATION WATER AND ITS ROLE IN PROTEIN DYNAMICS. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **19**, 205109 (2007) [siehe S. 136, 137].
- ⁴⁷³ C. Svanberg, P. Berntsen, ..., J. Swenson: STRUCTURAL RELAXATIONS OF PHOSPHOLIPIDS AND WATER IN PLANAR MEMBRANES. In: *The Journal of Chemical Physics* **130**, 035101 (2009) [siehe S. 136].
- ⁴⁷⁴ M. Monasterio, H. Jansson, ..., S. Cervený: CAUSE OF THE FRAGILE-TO-STRONG TRANSITION OBSERVED IN WATER CONFINED IN C–S–H GEL. In: *The Journal of Chemical Physics* **139**, 164714 (2013) [siehe S. 136].
- ⁴⁷⁵ J. Lopez, P. Ahuja, ..., G. Lippens: H/D EXCHANGE OF A ^{15}N LABELLED TAU FRAGMENT AS MEASURED BY A SIMPLE RELAX-EXSY EXPERIMENT. In: *Journal of Magnetic Resonance* **249**, 32–37 (2014) [siehe S. 138].
- ⁴⁷⁶ V. Chevelkov, K. Giller, ..., A. Lange: MEASUREMENT OF BACKBONE HYDROGEN-DEUTERIUM EXCHANGE IN THE TYPE III SECRETION SYSTEM NEEDLE PROTEIN PRG1 BY SOLID-STATE NMR. In: *Journal of Magnetic Resonance* **283**, 110–116 (2017) [siehe S. 138].
- ⁴⁷⁷ L. Vugmeyster, D. Ostrovsky, ..., R. L. Vold: DYNAMICS OF HYDROPHOBIC CORE PHENYLALANINE RESIDUES PROBED BY SOLID-STATE DEUTERON NMR. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **119**, 14892–14904 (2015) [siehe S. 138].
- ⁴⁷⁸ L. Vugmeyster, D. Ostrovsky, ..., I. B. Falconer: SOLVENT-DRIVEN DYNAMICAL CROSSOVER IN THE PHENYLALANINE SIDE-CHAIN FROM THE HYDROPHOBIC CORE OF AMYLOID FIBRILS DETECTED BY ^2H NMR RELAXATION. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **121**, 7267–7275 (2017) [siehe S. 138].
- ⁴⁷⁹ L. Vugmeyster, D. Ostrovsky: COMPARATIVE DYNAMICS OF METHIONINE SIDE-CHAIN IN FMOC–METHIONINE AND IN AMYLOID FIBRILS. In: *Chemical Physics Letters* **673**, 108–112 (2017) [siehe S. 138].
- ⁴⁸⁰ J. W. Mack, M. G. Usha, ..., R. J. Wittebort: BACKBONE MOTIONS IN A CRYSTALLINE PROTEIN FROM FIELD-DEPENDENT ^2H -NMR RELAXATION AND LINE-SHAPE ANALYSIS. In: *Biopolymers* **53**, 9–18 (2000) [siehe S. 138].

- ⁴⁸¹ M.-C. Bellissent-Funel: INTERNAL MOTIONS IN PROTEINS: A COMBINED NEUTRON SCATTERING AND MOLECULAR MODELLING APPROACH. In: *Pramana* **63**, 91–97 (2004) [siehe S. 138].
- ⁴⁸² L. S. Batchelder, C. H. Niu, D. A. Torchia: METHYL REORIENTATION IN POLYCRYSTALLINE AMINO ACIDS AND PEPTIDES: A DEUTERON NMR SPIN-LATTICE RELAXATION STUDY. In: *Journal of the American Chemical Society* **105**, 2228–2231 (1983) [siehe S. 140].
- ⁴⁸³ F. Qi, R. Böhmer, H. Sillescu: THE METHYL GROUP AS A BUILT-IN PROBE OF THE GLASSY DYNAMICS IN PROPYLENE CARBONATE. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **3**, 4022–4028 (2001) [siehe S. 143, 148].
- ⁴⁸⁴ L. Vugmeyster, D. Ostrovsky, A. S. Lipton: ORIGIN OF ABRUPT RISE IN DEUTERON NMR LONGITUDINAL RELAXATION TIMES OF PROTEIN METHYL GROUPS BELOW 90 K. In: *The Journal of Physical Chemistry B* **117**, 6129–6137 (2013) [siehe S. 143].
- ⁴⁸⁵ E. Rössler, M. Taupitz, H. M. Vieth: HETEROGENEOUS SPIN-LATTICE RELAXATION REVEALING THE ACTIVATION ENERGY DISTRIBUTION OF MOBILE GUESTS IN ORGANIC GLASSES. In: *The Journal of Physical Chemistry* **94**, 6879–6884 (1990) [siehe S. 144].
- ⁴⁸⁶ I. Roggatz, E. Rössler, ..., R. Richert: NONEXPONENTIAL ²H SPIN-LATTICE RELAXATION AND SLOW TRANSLATIONAL EXCHANGE IN DISORDERED SYSTEMS. In: *The Journal of Physical Chemistry* **100**, 12193–12198 (1996) [siehe S. 144].
- ⁴⁸⁷ G. Williams, D. C. Watts: MOLECULAR MOTION IN THE GLASSY STATE. THE EFFECT OF TEMPERATURE AND PRESSURE ON THE DIELECTRIC β RELAXATION OF POLYVINYL CHLORIDE. In: *Transactions of the Faraday Society* **67**, 1971–1979 (1971) [siehe S. 146].
- ⁴⁸⁸ P. A. Beckmann, C. E. Moore, A. L. Rheingold: METHYL AND T-BUTYL GROUP ROTATION IN A MOLECULAR SOLID: ¹H NMR SPIN-LATTICE RELAXATION AND X-RAY DIFFRACTION. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 1720–1726 (2016) [siehe S. 148].
- ⁴⁸⁹ D. G. Davis: PROTON NMR DETECTION OF LONG-RANGE HETERONUCLEAR MULTISPIN COHERENCES IN PROTEINS: THE COMPLETE ASSIGNMENT OF THE QUATERNARY AROMATIC ¹³C CHEMICAL SHIFTS IN LYSOZYME. In: *Journal of the American Chemical Society* **111**, 5466–5468 (1989) [siehe S. 150].
- ⁴⁹⁰ Y. Wang, T. C. Bjorndahl, D. S. Wishart: LETTER TO THE EDITOR: COMPLETE ¹H AND NON-CARBONYLIC ¹³C ASSIGNMENTS OF NATIVE HEN EGG-WHITE LYSOZYME. In: *Journal of Biomolecular NMR* **17**, 83–84 (2000) [siehe S. 150].
- ⁴⁹¹ G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, ..., K. I. Goldberg: NMR CHEMICAL SHIFTS OF TRACE IMPURITIES: COMMON LABORATORY SOLVENTS, ORGANICS, AND GASES IN DEUTERATED SOLVENTS RELEVANT TO THE ORGANOMETALLIC CHEMIST. In: *Organometallics* **29**, 2176–2179 (2010) [siehe S. 151].
- ⁴⁹² R. B. Gregory, M. Gangoda, ..., W. Su: THE INFLUENCE OF HYDRATION ON THE CONFORMATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN STUDIED BY SOLID-STATE ¹³C-NMR SPECTROSCOPY. In: *Biopolymers* **33**, 1871–1876 (1993) [siehe S. 151].
- ⁴⁹³ M. Lee, M. Hong: CRYOPROTECTION OF LIPID MEMBRANES FOR HIGH-RESOLUTION SOLID-STATE NMR STUDIES OF MEMBRANE PEPTIDES AND PROTEINS AT LOW TEMPERATURE. In: *Journal of Biomolecular NMR* **59**, 263–277 (2014) [siehe S. 151].
- ⁴⁹⁴ O. W. Howarth, D. M. J. Lilley: CARBON-13-NMR OF PEPTIDES AND PROTEINS. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **12**, 1–40 (1978) [siehe S. 151].
- ⁴⁹⁵ J.-M. Zanotti, M.-C. Bellissent-Funel, J. Parello: HYDRATION-COUPLED DYNAMICS IN PROTEINS STUDIED BY NEUTRON SCATTERING AND NMR: THE CASE OF THE TYPICAL EF-HAND CALCIUM-BINDING PARVALBUMIN. In: *Biophysical Journal* **76**, 2390–2411 (1999) [siehe S. 155].
- ⁴⁹⁶ D. Reichert, O. Pascui, ..., D. Huster: A SOLID-STATE NMR STUDY OF THE FAST AND SLOW DYNAMICS OF COLLAGEN FIBRILS AT VARYING HYDRATION LEVELS. In: *Magnetic Resonance in Chemistry* **42**, 276–284 (2004) [siehe S. 155].

- ⁴⁹⁷ E. Alberti, S. M. Gilbert, ..., A. M. Gil: STUDY OF HIGH MOLECULAR WEIGHT WHEAT GLUTENIN SUBUNIT 1DX5 BY ^{13}C AND ^1H SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY. I. ROLE OF COVALENT CROSSLINKING. In: *Biopolymers* **67**, 487–498 (2002) [siehe S. 155].
- ⁴⁹⁸ D. Idiyatullin, I. Nesmelova, ..., K. H. Mayo: COMPARISON OF $^{13}\text{C}_\alpha\text{H}$ AND ^{15}NH BACKBONE DYNAMICS IN PROTEIN GB1. In: *Protein Science* **12**, 914–922 (2003) [siehe S. 156].
- ⁴⁹⁹ V. Chevelkov, Y. Xue, ..., B. Reif: COMPARISON OF SOLID-STATE DIPOLAR COUPLINGS AND SOLUTION RELAXATION DATA PROVIDES INSIGHT INTO PROTEIN BACKBONE DYNAMICS. In: *Journal of the American Chemical Society* **132**, 5015–5017 (2010) [siehe S. 156].
- ⁵⁰⁰ Scipy – Scientific Python [siehe S. 164].
- ⁵⁰¹ NumPy – Numerical Python [siehe S. 164].
- ⁵⁰² PyQt4 [siehe S. 164].
- ⁵⁰³ PyQtGraph – Scientific Graphics and GUI Library for Python [siehe S. 164].
- ⁵⁰⁴ D. D. Traficante, M. Rajabzadeh: OPTIMUM WINDOW FUNCTION FOR SENSITIVITY ENHANCEMENT OF NMR SIGNALS. In: *Concepts in Magnetic Resonance* **12**, 83–101 (2000) [siehe S. 165].
- ⁵⁰⁵ R. Zorn: APPLICABILITY OF DISTRIBUTION FUNCTIONS FOR THE HAVRILIAK–NEGAMI SPECTRAL FUNCTION. In: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **37**, 1043–1044 (1999) [siehe S. 171].
- ⁵⁰⁶ P. A. Beckmann: SPECTRAL DENSITIES AND NUCLEAR SPIN RELAXATION IN SOLIDS. In: *Physics Reports* **171**, 85–128 (1988) [siehe S. 171].
- ⁵⁰⁷ R. Garrappa, F. Mainardi, M. Guido: MODELS OF DIELECTRIC RELAXATION BASED ON COMPLETELY MONOTONE FUNCTIONS. In: *Fractional Calculus and Applied Analysis* **19**, 1105–1160 (2016) [siehe S. 172].
- ⁵⁰⁸ M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov, B. Valeur: MATHEMATICAL FUNCTIONS FOR THE ANALYSIS OF LUMINESCENCE DECAYS WITH UNDERLYING DISTRIBUTIONS 1. KOHLRAUSCH DECAY FUNCTION (STRETCHED EXPONENTIAL). In: *Chemical Physics* **315**, 171–182 (2005) [siehe S. 172].
- ⁵⁰⁹ The UniProt Consortium: UNIPROT: THE UNIVERSAL PROTEIN KNOWLEDGEBASE. In: *Nucleic Acids Research* **45**, D158–D169 (2016) [siehe S. 180].
- ⁵¹⁰ L. H. Kapcha, P. J. Rossky: A SIMPLE ATOMIC-LEVEL HYDROPHOBICITY SCALE REVEALS PROTEIN INTERFACIAL STRUCTURE. In: *Journal of Molecular Biology* **426**, 484–498 (2014) [siehe S. 181].
- ⁵¹¹ D. Reichert, G. Hempel: RECEIVER IMPERFECTIONS AND CYCLOPS: AN ALTERNATIVE DESCRIPTION. In: *Concepts in Magnetic Resonance* **14**, 130–139 (2002) [siehe S. 183].
- ⁵¹² E. O. Stejskal, J. Schaefer: REMOVAL OF ARTIFACTS FROM CROSS-POLARIZATION NMR EXPERIMENTS. In: *Journal of Magnetic Resonance* (1969) **18**, 560–563 (1975) [siehe S. 183].

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

- seit 2012 Technische Universität Darmstadt
Promotionsstudium
- 2010 – 2012 Technische Universität Darmstadt
Physik, Master of Science
- 2008 – 2009 Helsingin Teknillinen Korkeakoulu
Erasmus-Austauschprogramm
- 2006 – 2010 Technische Universität Darmstadt
Physik, Bachelor of Science

PUBLIKATIONEN

- [I] D. Demuth, N. Haase, D. Malzacher, M. Vogel: EFFECTS OF SOLVENT CONCENTRATION AND COMPOSITION ON PROTEIN DYNAMICS: ^{13}C MAS NMR STUDIES OF ELASTIN IN GLYCEROL–WATER MIXTURES. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* **1854**, 995 – 1000 (2015).
- [II] D. Demuth, M. Sattig, E. Steinrücken, M. Weigler, M. Vogel: ^2H NMR STUDIES ON THE DYNAMICS OF PURE AND MIXED HYDROGEN-BONDED LIQUIDS IN CONFINEMENT. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **232**, 1059–1087 (2018).
- [III] K. Kämpf, D. Demuth, M. Zamponi, J. Wuttke, M. Vogel: PROTEIN-WATER COUPLING AS OBSERVED IN HYDRATED ELASTIN BY QUASIELASTIC NEUTRON SCATTERING. (In Vorbereitung).

Erklärung gemäß §9 Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlichen und paraphrasierten Zitate wurden angemessen kenntlich gemacht. Die Arbeit hat bisher noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Dominik Demuth